FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1968

THÈSE

N° 620

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Nicole ZECHOVSKY

Ancienne Externe des Hôpitaux de Paris
Interne des Hôpitaux de la Région Sanitaire de Paris
Née le 16 Mai 1939, à Draveil (Essonne)

Présentée et soutenue publiquement le 27 juin 1968

SEROLOGIE DE LA RUBEOLE PAR INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION

Son intérêt pour le diagnostic et pour l'épidémiologie fondé sur l'étude de 800 sérums en milieu hospitalier

Président : M. CHRISTOL, Professeur

IMPRIMERIE
R. FOULON & Cie
29, Rue Deparcieux, 29
PARIS — 1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1968

THÈSE

N°

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Nicole ZECHOVSKY

Ancienne Externe des Hôpitaux de Paris

Interne des Hôpitaux de la Région Sanitaire de Paris

Née le 16 Mai 1939, à Draveil (Essonne)

Présentée et soutenue publiquement le 27 juin 1968

SEROLOGIE DE LA RUBEOLE PAR INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION

Son intérêt pour le diagnostic et pour l'épidémiologie fondé sur l'étude de 800 sérums en milieu hospitalier

Président : M. CHRISTOL, Professeur

IMPRIMERIE

R. FOULON & Cie

29, Rue Deparcieux, 29

PARIS — 1968

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. Alajouanine (T.), Bénard (H.), Bernard (E.), Binet (L.), Bulliard (H.), Cathala (J.), Chabrol (E.), Chailley-Bert (P.), Cheymol (J.), Coste (F.), Debré (R.), Dechaume (M.), Galliard (H.), Gaudard d'Allaines (F. de), Gennes (L. de), Giroud (A.), Hazard (R.), Heuyer (G.), Lacomme (M.), Lamy (M.), Laroche (G.), Lelong (M.), Lévy (Mlle J.), Lévy-Solal (E.), Lian (C.), Maduro (R.), Marchal (G.), Mathieu (P.), Monod (R.), Moreau (R.), Moulonguet (P.), Pasteur Vallery-Radot, Petit-Dutaillis (D.), Piédelièvre (R.), Quénu (J.), Renard (G), Senèque (J.), Strohl (A.), Tanon (L.), Turpin (R.), Verne (J.).

Doyen : Georges BROUET

1er assesseur : Daniel BARGETON — 2e assesseur : Jean GOSSET

A. — CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

	MM.
Anatomie	Delmas (A.)
—	Huard (P.)
à titre personnel.	Cabrol (Ch.)
—	Olivier (G.)
Anatomie et Cytologie path.	Delarue (J.)
à titre personnel.	Nezelof (Ch.)
—	Orcel (L.)
Biochimie médicale	Jayle (M.-F.)
—	Desgrez (P.)
—	Polonovski (J.)
Chimie pathologique	Schapira (G.)
à titre personnel.	Cartier (P.)
—	Dreyfus (J.-Cl.)
Biologie médicale	
à titre personnel.	Bourlière (F.)
—	Hartmann (L.)
Biophysique médicale	Bugnard (L.)
—	Djourno (A.)
—	Dognon (A.)
à titre personnel.	Kellershohn (L.)
—	Gougerot (L.)
—	Roucayrol (J.-Cl.)

	MM.
Cancérologie expérimentale	Mathé (G.)
Génétique fondamentale	Lejeune (J.)
Histologie et Embryologie.	Coujard (R.)
—	Tuchmann-Duplessis (H.)
à titre personnel.	Racadot (J.)
Microbiologie	Fasquelle (R.)
Bactériologie et Virologie.	Tournier (P.)
à titre personnel.	Barbier (P.)
Parasitologie	Larivière (M.)
Pathologie expér. et comp.	Merklen (F.-P.)
à titre personnel.	Lœper (J.)
Pharmacologie	Boissier (J.-R.)
—	Lechat (P.)
Physiologie	Bargeton (D.)
—	Malmejac (J.)
—	Parrot (J.)
à titre personnel.	Dejours (P.)
Physiologie et biolog. appl. aux sports	Scherrer (J.)

B. — CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

1° MEDECINE

Biologie médicale	Fauvert (R.)
Histoire de la Médecine et de la Chirurgie	Coury (Ch.)
Hygiène et Médecine prév.	Boyer (J.)
Médecine du Travail	Desoille (H.)
Médecine légale, Droit méd. et déontologie	Derobert (L.)
Pathologie exotique	Brumpt (L.-C.)
Pathologie médicale	Buge (A.)
—	Bricaire (H.)
—	Cornet (A.)
—	Housset (E.)
—	Laroche (Cl.)
à titre personnel.	Azerad (E.)
—	Bour (H.)

Pathologie médicale à titre personnel	
—	Brocard (H.)
—	Caroli (J.)
—	Facquet (J.)
—	Lambling (A.)
—	Launay (Cl.)
—	Payet (M.)
—	Perrault (M.)
—	Siguier (F.)
—	Worms (R.)
—	Bouvier (J.)
Pathologie respiratoire	Turiaf (J.)
Pathologie et Thér. géné.	Maurice (P.)
Thérapeutique	Lamotte (M.)
Thérapeutique appliquée	Marche (J.)

Chaires de Cliniques :

MM.

Cliniques :
— cardiol. (Boucicaut) .. Lenègre (J.)
— cardiol. (Broussais) .. Soulié (P.)
— dermatol. (Saint-Louis). Duperrat (F.)
— maladies cutanées et syphilit. (Saint-Louis) . Degos (R.)
— endocrinolog. (Pitié) .. Decourt (J.)
— malad. infect. (Claude-Bernard) ..... Mollaret (P.)
à titre personnel. Bastin (R.)
— malad. mentales et de l'encéph. (Sainte-Anne). Delay (J.)
à titre personnel (neuro-psychiatrie) ..... Pichot (P.)
— malad. du système nerveux (Salpêtrière) .... Castaigne (P.)
— neurolog. (Salpêtrière) . Garcin (R.)
à titre personnel. Lhermitte (F.)
— neuro-psychiatrie infant. (Salpêtrière) ..... Michaux (L.)
— maladies du sang (Broussais) ..... Bernard (J.)
à titre person. (hématol.) André (R.)
— — Bousser (J.)
— — Dreyfus (B.)
— médicales : *Bicêtre :* Deparis (M.) - *Broussais :* Milliez (P.) - *Cochin :* Péquignot (H.) - *Hôtel-Dieu :* Bariety (M.) - *Pitié :* Dreyfus (G.) - *Saint-Antoine :* Boudin (G.); Conte (M.); Kourilsky (R.).
— médicale propédeutique (Broussais) ..... Justin-Besançon (L.)
— thérapeutique médicale (Saint-Antoine) ..... Lemaire (A.)
— Séméiologie médicales (Antoine-Chantin) .... Domart (A.)
Séméiol. méd. (Lariboisière) Bouvrain (Y.)
— (Pitié) ..... Rambert (P.)
— (Rothschild). Wolfromm (R.)

Cliniques :
— d'Hydrologie et de Climatologie (Bichat) .... Debray (Ch.)
à titre personnel. Giberton (A.)

Cliniques :
— médico-sociale du diabète sucré et des maladies métabol. (Hôtel-Dieu) ..... Derot (M.)
— néphrologique (Necker). Hamburger (J.)
à titre personnel. Richet (G.)
— Crosnier (J.)
— Génét. médic. (Enfants-Malades) ..... Royer (P.)
— maladies des enfants (Enfants-Malades) .... Mozziconacci (P.)
— médicale infantile et de pédiat. sociale (Enfants-Malades) ..... Marie (J.)
— pédiatrie (Trousseau) . Brissaud (H.)
à titre personnel. Lesobre (R.)
— pédiatrie et de puéricul. (Saint-Vincent-de-Paul) Thieffry (S.)
Hygiène et Clinique de la 1re enfance (Trousseau) Laplane (R.)
à titre personnel. Polonovski (Cl.)

Cliniques :
— pneumo-phtisiologie (Laennec) ..... Brouet (G.)
à titre personnel. Kreis (B.)
— Meyer (A.)
— rééducation motrice ... Grossiord (A.)
Electroradiologie ..... Ledoux-Lebard (M.)
— ..... Lefebvre (J.)
Radiologie médicale ..... Desgrez (H.)
à titre personnel. Fischgold (H.)
— Tubiana (M.)
— Cherigie (E.)

Cliniques :
— rhumatologie médicale et sociale (Cochin) .... Delbarre (F.)
— rhumatol. (Lariboisière). Sèze (S. de)
— toxicologique (Fernand-Widal) ..... Gaultier (M.)

2° CHIRURGIE

Anesthésiologie ..... Vourc'h (G.)
Pathologie chirurgicale ... Laurence (G.)
— ... Kuss (R.)
— ... N...

Path. chirur. à titre person. Ramadier (J.)
Physiologie et path. obstét. Morin (P.)
Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale . Monsaingeon (A.)

Chaires de Cliniques :

Cliniques :
— carcinolog. (Gustave-Roussy) ..... Denoix (P.)
— carcinologique chirurg. (Necker) ..... Redon (H.)
à titre personnel. Bréhant (J.)
— chirurgicales : *Beaujon :* Lortat-Jacob (J.-L.); Baumann (J.) - *Cochin :* Léger (L.) - *Hôtel-Dieu :* Patel (J.) - *Saint-Antoine :* Gosset (J.) - *Salpêtrière :* Sicard (A.) - *Tenon :* Olivier (Cl.).
— thérap. chirur. (Vaugirard) ..... Roux (M.)

Séméiologie et Clinique chirurg. (Broussais) .... Poilleux (F.)
Séméiologie et Clinique chirurg. (Saint-Louis) .. Debeyre (J.)

Cliniques :
— chirurg. orthopéd. et traumatol. (Cochin) ... Merle d'Aubigné (R.)
— chirurg. orthopéd. et traumatol. (Foch) .... Padovani (P.)

A MON MAITRE ET PRESIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR DANIEL CHRISTOL

Professeur à la Faculté de Médecine de Paris

Biologiste des Hôpitaux

Chef de Service à l'Hôpital Claude-Bernard

Qui nous a fait le très grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

A Madame le Docteur Y. PÉROL

Assistant-Chef de Travaux
au Centre Hospitalo-Universitaire de Paris
Responsable de la Section de Virologie
au Laboratoire Central de l'Hôpital Claude-Bernard

A Monsieur le Professeur R. FASQUELLE

Professeur de Microbiologie
à la Faculté de Médecine de Paris
Biologiste des Hôpitaux

A Monsieur le Docteur Yves NURIT

Biologiste

Chef de Service au Centre Hospitalier de Villeneuve-Saint-Georges

A MES MAITRES
DANS LES HOPITAUX DE PARIS
ET DE LA RÉGION DE PARIS

Externat :

Monsieur le Professeur J. LOEPER

Monsieur le Professeur G. BROUET
Doyen de la Faculté de Médecine de Paris

Monsieur le Professeur J. BOUSSER

Monsieur le Professeur Agrégé J. DI MATTÉO

Monsieur le Professeur Ch. DEBRAY

Monsieur le Professeur R. WORMS

Monsieur le Professeur Jean BERNARD

Monsieur le Professeur Claude LAROCHE

Internat de la région sanitaire de Paris :

Monsieur le Docteur G. DUCHÉ

Monsieur le Docteur Y. NURIT

Monsieur le Docteur A. ABAZA

A MES MAITRES

DES CHAIRES DE MICROBIOLOGIE,

DE BACTÉRIOLOGIE ET DE VIROLOGIE

DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

A Madame L. JAILLARD

et A Mademoiselle D. NOYGUES

Laborantines au Laboratoire Central de l'Hôpital Claude-Bernard

A Mesdames H. FICHOT, A. TRÉHIN,
N. FRANCIS, C. GLAVNIK,
Mademoiselle M.-J. MARIN,
Mesdames REIGNARD, J. GUICHETEAU, N. GAUDRY
et Monsieur J. JOURNAUX

Laborantines et Laborantin
au Centre Hospitalier de Villeneuve-Saint-Georges

INTRODUCTION

La rubéole est une maladie infectieuse, transmissible, conférant une immunité complète et définitive, et dont la nature virale est actuellement démontrée.

Elle revêt habituellement la forme d'une fièvre éruptive, mais peut se manifester par des symptômes atypiques ou atténués, et même être cliniquement inapparente.

Bénigne dans la grande majorité des cas, elle est susceptible, lorsqu'elle survient pendant la gestation, d'entraîner de graves embryo-fœtopathies.

Les formes frustes ou inapparentes sont aussi contagieuses que les formes typiques et leur pronostic est alourdi par le même risque fœtal ; il est donc très important d'avoir à sa disposition des méthodes sérologiques suffisamment précises et sûres, permettant, d'une part de rattacher à la rubéole de façon certaine des symptômes trompeurs et de dépister des formes inapparentes, d'autre part de reconnaître les femmes porteuses d'anticorps, donc immunisées, et les femmes réceptives à la maladie qui pourraient, dans un proche avenir, bénéficier de la vaccination.

Après l'isolement du virus en 1961-1962, de nombreuses recherches avaient abouti à la mise au point d'un diagnostic sérologique de la rubéole, au moyen de techniques peu fidèles, ou de procédés plus valables mais longs et coûteux, et d'application trop délicate pour les laboratoires non spécialisés.

C'est ainsi que l'on avait utilisé :

— d'abord la réaction de neutralisation, soit de l'effet cytopathogène directement observable, soit du phénomène d'interférence ;

— puis la réaction d'immunofluorescence et de fixation du complément.

En 1966, la découverte par Parkman et Meyer du pouvoir hémagglutinant du virus sur certains globules rouges permit d'appliquer au virus de la rubéole la réaction d'inhibition de l'hémagglutination, déjà utilisée pour le diagnostic des myxovirus.

Le but du présent travail est d'apprécier la valeur du test d'inhibition de l'hémagglutination appliqué au diagnostic et à l'épidémiologie de la rubéole.

Notre étude est fondée sur l'examen de 800 sérums, effectué avec Madame le Docteur Y. Pérol, dans le Service du Professeur D. Christol, à l'Hôpital Claude-Bernard ; on peut, nous le pensons, accorder à ce chiffre une réelle valeur statistique.

Après un rappel historique, clinique et biologique concernant la rubéole et l'exposé des différents tests sérologiques connus auparavant, nous préciserons le principe du test d'inhibition de l'hémagglutination ; nous comparerons les différentes techniques déjà proposées avec celle que nous avons utilisée et nous discuterons les résultats personnellement obtenus.

CHAPITRE I

HISTORIQUE

La sérologie appliquée à la rubéole prit son essor après la mise en évidence de la nature virale de la maladie.

Dans l'histoire de la rubéole, l'ère virologique et sérologique succède à deux périodes essentiellement cliniques.

• La première période (1740-1941) *aboutit à l'identification et à la description de la maladie.*

Ce n'est qu'assez tardivement que la rubéole fut individualisée. Après avoir été signalée par Hoffman (1740), elle fut peu à peu séparée de la rougeole et des autres maladies éruptives (Fritsch, 1786 ; Maton, 1819). La première description complète en fut donnée par Thomas (1874) et la rubéole fut reconnue comme maladie autonome au Congrès International de Londres de 1881 (William Squire); une thèse lyonnaise de médecine y fut consacrée (Delestre, 1883).

• La seconde période s'ouvrit en 1941 et fut marquée par la mise en évidence et par la description des *embryopathies rubéoliques.*

Ce fut à Gregg (1941) que revint le mérite d'avoir su reconnaître que la rubéole était susceptible de provoquer de graves embryopathies. De nombreuses publications furent faites, concernant le type des malformations observées, l'âge de la grossesse où elles surviennent, leur fréquence.

Parallèlement, on apprit à connaître les formes atypiques ou atténuées, mais cependant contagieuses, de la maladie.

• La période virologique commença en 1962.

Certes, dès 1938, la nature virale de l'affection fut suspectée par Hiro et Tasaka, par Habel (1947), Anderson (1949) et Krugman (1953), qui la transmettent expérimentalement au singe et à l'homme.

Mais pendant plusieurs années, malgré des recherches incessantes, le virus de la rubéole échappait à toutes les tentatives d'isolement. C'est que, sur les cellules en culture habituellement utilisées, il ne donne pas d'effet cytopathogène rapide et net. Il fallait donc conserver les tubes de cultures cellulaires plusieurs semaines, et l'on se heurtait alors à des écueils, notamment des phénomènes de dégénérescence cellulaire difficiles à interpréter et à différencier d'un effet cytopathogène spécifique.

Pourtant, c'est en étudiant l'effet cytopathogène obtenu sur cellules amniotiques humaines, que WELLER et NEVA, en 1961-1962, à la Harvard School of Public Health de Boston, isolèrent le virus, à partir du sang et des urines de rubéoleux.

Dans le même temps, PARKMAN, BUESCHER et ARTENSTEIN, au Walter Reed Army Institut of Research, à Washington, isolaient le virus par interférence avec le virus ECHO 11 sur des cellules de singe *Cercopithecus aethiops*.

Comparant leurs souches virales, les deux équipes concluent qu'elles sont identiques, et qu'il n'existe qu'un seul type sérologique de virus.

Par la même technique d'interférence, VÉRONELLI, MAASSAB et ses collaborateurs isolent également le virus. Des travaux ultérieurs (MC CARTHY, TAYLOR-ROBINSON) confirment les premiers résultats.

Cette découverte du virus en 1962, puis la grande épidémie survenue aux U.S.A. en 1964-1965 qui a fourni un matériel d'étude considérable, permirent de progresser :

— en mettant l'accent, au point de vue clinique, sur certains aspects peu connus de la rubéole, et singulièrement le syndrome de rubéole congénitale ;

— en éclairant la physio-pathologie de cette maladie ;

— en améliorant les techniques virologiques.

Elles permirent la mise au point de techniques d'interférence rigoureuses dans leurs modalités, et de systèmes cellulaires où le virus adapté produit un effet cytopathogène rapide et caractéristique.

Cependant le virus lui-même reste mal connu, et sa morphologie en microscopie électronique peu précise. Sa classification n'est pas formellement établie. D'abord considéré comme voisin des Paramyxovirus, il a été récemment rapproché des Arbovirus (HOLMES et WARBURTON, 1967).

En revanche, la sérologie fit d'immenses progrès et l'on mit au point une technique de neutralisation, soit de l'effet cytopathogène, soit de l'interférence, une technique d'immunofluorescence indirecte, et l'on purifia un antigène fixant le complément.

Mais le pouvoir hémagglutinant du virus ne fut mis en évidence qu'en septembre 1966 (Parkman et Meyer). Ceci allait être à l'origine de l'application de la technique d'inhibition de l'hémagglutination à la rubéole, ce qui simplifie grandement le diagnostic sérologique de la maladie en cours et permet également son diagnostic rétrospectif.

Les efforts des chercheurs tendent actuellement vers la mise au point de souches virales atténuées vaccinantes, dénuées de toute action pathogène.

En 1967, Meyer et Parkman ont publié les résultats de leurs premiers essais avec la souche HPV-77 ; Hilleman (souche Benoit) et Plotkin (souche RA-27) aux Etats-Unis, Huygelen, Prinzie et Peetermans (souche Cendehill) en Belgique, ont eux aussi mis au point des souches atténuées et en ont décrit les caractéristiques.

Si ces premiers essais de vaccination, qui semblent encourageants, sont confirmés par des travaux complémentaires, on peut espérer qu'enfin disparaîtront, dans un proche avenir, les si redoutables embryo-fœtopathies rubéoliques.

CHAPITRE II

CLINIQUE

I. — EPIDEMIOLOGIE

La rubéole est une maladie infectieuse.

La transmission nécessite toujours un contact direct. Elle se fait par voie rhino-pharyngée, plus rarement par voie conjonctivale. Les contacts répétés de type familial augmentent le risque de contagion.

La maladie a pu être réalisée expérimentalement chez l'homme (GREEN et coll. ; SCHIFF et SEVER ; KRUGMAN) et cette maladie expérimentale est elle-même transmissible soit sous sa forme typique, soit sous une forme très atténuée.

La période de contagiosité est précoce, bien avant l'éruption, puisque le virus est excrété par voie naso-pharyngée une semaine avant celle-ci. Ce fait rend impossible la prévention des contages. Elle dure ensuite une dizaine de jours après l'éruption ; mais les enfants nés de mère ayant eu la rubéole pendant le premier trimestre de leur grossesse peuvent excréter le virus durant plusieurs mois et être, de ce fait, facteurs de dissémination de la maladie.

La contamination se fait :

— par l'intermédiaire des enfants ou des adultes atteints de rubéole acquise ;

— par les nouveau-nés atteints de rubéole congénitale ;

— par les nouveau-nés, de mère ayant eu la rubéole, apparemment normaux mais porteurs de virus.

La maladie atteint *surtout la seconde enfance* et est assez fréquente chez les adolescents. Elle survient rarement avant six mois, mais peut se voir si la mère n'a pas eu la rubéole. Les adultes épargnés se contaminent au contact des enfants, et après quarante ans l'immense majorité de la population est immunisée.

La rubéole est une *maladie saisonnière,* qui évolue par petites épidémies en hiver et surtout au printemps. Les premiers cas apparaissent en décembre, le plus grand nombre évoluent de mars à mai, ils deviennent rares en juin. Contrairement à la rubéole, les affections dues aux Entérovirus surviennent à la fin de l'été et en automne ; cette notion saisonnière est importante pour le diagnostic des exanthèmes.

La variation saisonnière de la rubéole a pour conséquence une variation saisonnière des malformations congénitales dont le nombre est maximum en novembre et en décembre.

Les *épidémies* ne sont pas habituellement massives ; cependant, on connaît les épidémies importantes avec leurs si graves conséquences fœtales qui sont survenues en Australie, en Suède, en Angleterre, aux Etats-Unis. Le cycle de ces épidémies est d'environ sept ans.

II. — LA RUBEOLE ACQUISE DE L'ENFANT ET DE L'ADULTE

L'incubation, silencieuse, est en moyenne de quatorze jours. Cette durée d'incubation est confirmée par l'étude de la rubéole expérimentale.

L'invasion dure de quelques heures à un ou deux jours, marquée par des signes généraux discrets, un léger catarrhe rhino-pharyngé, avec parfois déjà des signes très évocateurs : adénopathies sous-angulo-maxillaires, surtout sous-occipitales et mastoïdiennes. Mais bien souvent l'éruption apparaît comme le premier symptôme.

L'éruption commence au visage, d'une rougeur intense, parfois cramoisie. Elle se généralise d'emblée ou bien apparaît successivement en plusieurs points, de façon capricieuse, sans ordre ni symétrie. Elle respecte inconstamment les paumes et les plantes.

L'exanthème est polymorphe, fait de taches circulaires ou ovalaires, à contours réguliers, rosées ou rouges, laissant des intervalles de peau saine, sans prurit. Il peut revêtir un aspect scarlatiniforme aux plis de flexion et aux zones d'extension des membres.

Sa durée est courte ; il disparaît en deux à trois jours. On a décrit des poussées éruptives successives.

Un énanthème, très discret, peut suivre l'éruption.

Habituellement, les signes généraux sont peu intenses. La fièvre, si elle existe, peut prendre tous les types.

Il n'y a habituellement aucune manifestation viscérale, seule la rate est augmentée de volume.

Le signe le plus important et le plus caractéristique est la présence d'*adénopathies,* qui peuvent précéder l'éruption. Multiples, pouvant atteindre la plupart des groupes ganglionnaires, elles sont plus caractéristiques dans leur localisation épitrochléenne et surtout cervicale postérieure. De volume moyen, elles sont indolores, ou bien douloureuses spontanément ou à la pression, recouvertes d'une peau normale.

La *guérison* est habituellement acquise en quelques jours. La rubéole est en effet une maladie très bénigne en général.

Cependant, *le diagnostic de rubéole* est très difficile, car les formes typiques où sont associés tous les symptômes ne sont pas les plus fréquentes. Au cours de l'épidémie des îles Pribilofs, Schiff et Sever ne rapportent que 60 % de cas associant éruption et adénopathies.

Il existe très fréquemment des formes *atypiques, atténuées* ou *inapparentes,* et de façon exceptionnelle des formes *compliquées.*

L'*exanthème* peut être modéré, ou revêtir un aspect trompeur morbilliforme, scarlatiniforme, polymorphe. Il peut manquer et la présence d'adénopathies prend une réelle valeur : dans l'épidémie de Pribilofs, 40 % des malades avaient une forme ganglionnaire pure.

Il n'existe parfois *aucune anomalie clinique* ou, au contraire, dans quelques cas, des *manifestations particulières* peu habituelles dominent la symptomatologie clinique. Ce sont des *manifestations nerveuses* (méningites, méningo-encéphalites, encéphalites pures, myélites ou radiculo-névrites). Rarissimes, certes, les méningo-encéphalites et les encéphalites sont mortelles dans 20 % des cas environ.

Les *manifestations hématologiques* sont représentées essentiellement par le purpura thrombopénique, apparaissant entre le deuxième et le onzième jour de l'éruption, surtout chez la petite fille, durant de quatre jours à quatre semaines. Il existe une thrombocytopénie périphérique sans altération apparente de la lignée mégacaryocytaire.

Les *manifestations rhumatismales* comprennent :
— des myalgies ;
— des sciatiques ;
— surtout des arthrites.

Johnson et Hall en notent plusieurs cas avec 90 % de sujets présentant une réaction au latex positive.

Il s'agit de polyarthrites, survenant essentiellement chez la femme entre vingt et cinquante ans, la veille de l'éruption, jusqu'au troisième jour, touchant avec prédilection les articulations métacarpo-phalan-

giennes, puis les doigts, les poignets, les genoux, souvent de façon symétrique. Accompagnées de fièvre et de myalgies, elles guérissent au maximum en quatre semaines, souvent en une dizaine de jours.

Il est évident que dans toutes ces formes atypiques par l'absence de symptômes ou par une symptomatologie inhabituelle, le *diagnostic* ne peut être confirmé que par les examens de laboratoire, essentiellement la *sérologie*.

En effet, l'hémogramme ne peut emporter la conviction. On signale la leucopénie, avec augmentation des monocytes ; mais la plasmocytose, sur laquelle on insistait beaucoup, est loin d'être constante. Elle est souvent à un chiffre peu significatif et de plus n'a aucune spécificité, puisqu'elle peut exister dans bien d'autres éruptions d'origine virale. Quoi qu'il en soit, il s'agit de plasmocytes normaux et le médullogramme est normal.

La réaction de Paul et Bunnel est toujours négative.

L'avènement des réactions sérologiques dans la rubéole et particulièrement de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination, a ainsi permis de différencier les maladies éruptives atypiques, rougeole, scarlatine, et les éruptions rubéoliformes qui peuvent être dues à des Entérovirus : virus Coxsackie ou virus Echo, des Adénovirus, parfois des Myxovirus.

III. — LA RUBEOLE CONGENITALE

Lorsque la rubéole survient chez la femme enceinte, elle peut déter miner des embryo-fœtopathies de gravité variable. Le premier travail de l'ophtalmologiste australien Gregg (1941) a été confirmé d'une part, par des enquêtes épidémologiques et statistiques, d'autre part, plus récemment par des arguments virologiques et immunologiques qui ne laissent plus persister aucun doute sur la responsabilité de la rubéole.

Dès les premières publications furent décrites des malformations qui devinrent classiques et furent groupées sous le nom d'embryopathie rubéolique.

Mais, en 1964, la grande épidémie américaine de rubéole fut responsable de la naissance d'environ 50.000 enfants anormaux, dont plus de 20.000 présentaient des anomalies majeures. L'étude de cette épidémie permit de préciser l'importance de l'âge de la grossesse dans la fréquence et le type des anomalies. Elle permit avec l'aide de la virologie et de la sérologie, de rapporter à la rubéole un certain

nombre de manifestations jusque-là mal connues. Elle aboutit à la description de la rubéole congénitale du nouveau-né, maladie évolutive, différente de l'embryopathie tératogène à laquelle elle peut d'ailleurs être associée.

La notion d'infection virale chronique a été prouvée. Le virus est retrouvé dans la plupart des organes lors des nécropsies d'enfants atteints de rubéole congénitale. D'autre part, les enfants vivants excrètent le virus pendant plusieurs mois. De plus, des nouveau-nés apparemment sains, dont la mère avait contracté la rubéole pendant la grossesse, ou même chez laquelle on ne retrouvait pas la notion *clinique* de rubéole, ont été découverts porteurs de virus. On peut se demander si, dans ces cas, des anomalies du développement physique ou mental ne se révèleront pas au cours des années.

Les tentatives d'isolement du virus à partir des produits d'avortements thérapeutiques décidés à la suite d'une rubéole maternelle survenue pendant les premiers mois de la grossesse ont précisé le passage du virus à travers le placenta.

Le virus a pu être isolé dans la moitié des cas environ, mais il est intéressant de noter, comme l'ont bien précisé Alford, Weller et Neva, que lorsque la rubéole s'était déclarée pendant les huit premières semaines de la grossesse, le virus était trouvé à la fois dans le placenta et dans les tissus de l'embryon. Si la rubéole survenait après la huitième semaine, il était isolé beaucoup plus souvent du seul placenta. Ce phénomène est peut-être dû à une maturation du placenta ou du fœtus lui-même. Il confirme la notion selon laquelle le risque de malformations est maximum pendant les deux premiers mois de la grossesse, est encore important au cours du troisième mois, et diminue ensuite.

Ce risque de malformations a été diversement apprécié, étant donné les difficultés de reconnaître la maladie maternelle et aussi parce que certaines anomalies ne sont reconnues que tardivement, après l'âge de un an.

L'enquête de Lamy et Séror trouve 95 % de malformés lorsque la rubéole maternelle survient pendant les sept premières semaines de la grossesse, et seulement 20 % entre la neuvième et la dix-huitième semaine.

Heggie trouve une incidence de malformations de 10 à 30 % si la rubéole survient pendant le premier trimestre, avec un maximum pour le premier mois, alors que le pourcentage tombe à 5 % au quatrième mois.

Mais Sever a constaté des rubéoles congénitales à la suite de rubéole maternelle pendant le deuxième trimestre.

Enfin, certains faits exceptionnels ont été observés, par Mc Cracken d'une part, et Horstmann d'autre part, qui signalent la possibilité d'une contamination du fœtus pendant les derniers jours de la grossesse. Dans ces cas, le nouveau-né a une rubéole du même type que celle de l'enfant.

Cependant, on peut admettre raisonnablement le quatrième mois de grossesse comme limite à partir de laquelle les malformations et les anomalies sont exceptionnelles.

Nous décrirons séparément le syndrome malformatif et la rubéole congénitale, en sachant que les malformations coexistent très fréquemment avec les lésions évolutives ; c'est ainsi que Korones et coll. (1965) observent une malformation cardiaque chez chacun des 22 enfants porteurs d'un syndrome de rubéole congénitale, une cataracte chez 16 d'entre eux ; Cooper signale 67 % de cardiopathies et 45 % de lésions oculaires.

Krugman, étudiant les cas de 344 enfants de huit à dix-huit mois atteints de rubéole congénitale après l'épidémie de 1964, trouve :

— 73 enfants normaux (21 %) ;
— 271 enfants anormaux (79 %), avec :

— affections cardiaques	52 %
— surdité	52 %
— cataractes ou glaucome	40 %
— retards psycho-moteurs :	
moyens	16 %
sévères	24 %
— purpura néonatal	31 %
— mortalité	13 %

A. — Le syndrome malformatif

Les localisations classiques de l'embryopathie rubéolique sont bien connues :

— oculaires ;
— auriculaires ;
— cardiaques.

1° Les manifestations oculaires sont présentes dans la moitié des cas environ et consistent essentiellement en une *cataracte* uni ou bilatérale.

Ce fut la lésion que Gregg observa en 1941 chez 78 nourrissons dont la mère avait contracté la rubéole pendant la grossesse. Il s'y associait un faible poids de naissance et très souvent des malformations cardiaques.

La cataracte s'accompagne de *microphtalmie* dans plus de la moitié des cas, parfois de *lésions de l'iris* ou de la *rétine* (pseudo-rétinite pigmentaire) et, dans 3 à 4 % des cas, de *glaucome* (Weiss, Cooper, Green).

Le virus est très souvent isolé des milieux oculaires ou du cristallin lors des interventions.

2° L'atteinte de l'oreille interne (30 % des cas), souvent asymétrique, parfois unilatérale, partielle, se traduit par une surdité de perception due à un défaut du développement de l'organe de Corti et de la cochlée. Elle peut n'être reconnue que tardivement et aggraver les troubles mentaux.

3° Parmi les malformations cardiaques, les plus communes sont la persistance du canal artériel, les communications inter-auriculaire et inter-ventriculaire, les sténoses pulmonaires.

En fait, toutes les lésions peuvent se voir. Heggie, d'après les statistiques les plus récentes, estime leur fréquence à 79,3 %.

4° Les manifestations neurologiques sont difficiles à étudier.

Des convulsions, des modifications de l'électro-encéphalogramme ont pu être constatées (Lindquist et coll.).

On peut observer aussi une microcéphalie (10 % des cas pour Horstmann), une tension de la fontanelle (Rudolph).

Le recul est insuffisant pour un bilan neurologique définitif somatique et mental, d'autant plus que la surdité peut être un facteur de retard du développement (Sheridan, 1964).

A l'autopsie d'enfants morts de rubéole congénitale, on a pu trouver une leucomalacie périventriculaire et des calcifications périvasculaires, ainsi que des hémorragies (Lindquist et coll., Naeye et Blanc).

5° D'autres manifestations ont été signalées :

— des *malformations dentaires* : retard d'éruption de la dent de lait, hypoplasie et agénésie dentaires ;
— des *malformations génito-urinaires* ;
— des *malformations crânio-encéphaliques* : microcéphalie avec retard psychique (Horstmann) ; manifestations épileptiques, athétosiques, paraplégiques, anomalies encéphalographiques ;
— des *malformations du tractus digestif* ;
— des anomalies de la *peau* (fossettes et rides : Hammond) et des *dermatoglyphes* (Achs et coll., Alter et coll.).

Grâce à la rigueur diagnostique des méthodes sérologiques, il est maintenant possible d'éliminer les malformations qui sont sans rapport avec la rubéole et aussi de rattacher avec certitude à cette affection d'autres manifestations groupées sous le nom de rubéole congénitale évolutive.

B. — Le syndrome de rubéole congénitale évolutive

Un certain nombre de manifestations sont en effet la conséquence de l'infection virale prolongée.

1° Tout d'abord la MORTINATALITÉ est importante, alors que la prématurité est exceptionnelle.

MANSON, LOGAN et LOY citent 4,7 % d'accouchements prématurés contre 4,4 % dans une population témoin.

D'autre part, d'après KRUGMAN et COOPER, le risque de mortalité serait de 10 à 25 % pendant les six premiers mois de la vie, et environ un tiers des enfants atteints meurent avant l'âge de un an.

Bien que la durée de la gestation soit normale (39,2 semaines pour KORONES), le poids moyen de naissance est faible : 2,200 kg. D'après les statistiques de RUDOLPH, le poids moyen serait de :

— 2,533 kg en cas de syndrome malformatif ;

— 2,178 kg en cas de rubéole congénitale évolutive, alors que le poids moyen des enfants normaux est de 3,327 kg.

La taille est également inférieure à la normale. Cette hypotrophie peut persister pendant quelques mois ou quelques années. D'après LUNDSTRÖM, entre un et trois ans, 27 % des enfants ont une taille inférieure et 20 % un poids inférieur à la normale.

2° DES ANOMALIES SANGUINES sont très fréquentes : le *purpura thrombopénique* est la manifestation la plus caractéristique.

Il existe dès la naissance ou apparaît dans les quarante-huit premières heures. Exceptionnellement, il peut être retardé, observé le quatorzième jour (PLOTKIN, OSKI, HARTNETT et coll.) ou même du deuxième au neuvième mois. Il consiste en un semis de macules de 3 à 8 mm de diamètre, diffuses ou prédominant sur le thorax, accompagnées parfois d'ecchymoses. Les hémorragies viscérales sont rares.

Il disparaît en quelques jours, parfois en deux ou trois semaines ; il peut cependant persister plusieurs mois (COOPER, GREEN et coll.) ou évoluer par poussées (REISS et RYLES).

Le chiffre de plaquettes, toujours inférieur à 100.000, redevient normal en moins de quatre mois et le plus souvent en un mois. Il

existe une diminution du nombre des mégacaryocytes médullaires, dont la morphologie est cependant normale. Habituellement, il n'y a pas d'anticorps antiplaquettaires ; Bayer, Sherman et coll. en ont observé dans 6 cas ; ces auteurs insistent sur le rôle des facteurs vasculaires associés.

L'*anémie* est fréquente, mais moins étudiée. C'est une anémie hémolytique avec hyperplasie érythroblastique médullaire et érythroblastose périphérique possible et parfois importante. La réticulocytose est élevée et on peut voir des altérations morphologiques des hématies.

Très rarement, c'est une anémie hypoplasique.

Enfin peuvent exister, comme dans d'autres maladies virales, des *microthromboses* viscérales (Mc Kay et Margaretten).

3° Des manifestations hépato-spléniques : *l'hépatomégalie*, qui peut persister plusieurs mois, est fréquente (65 % des cas pour Heggie ; 9 cas sur 22 pour Korones et coll.), de même que la *splénomégalie* (5 cas sur 22 pour Korones).

Des *hépatites* vraies ont été décrites (Monif, Plotkin) survenant dans les vingt-quatre à quarante-huit premières heures ; les modifications biologiques sont assez mal précisées : augmentation du cholestérol total, des transaminases sériques.

L'étude histologique par ponction-biopsie du foie montre des lésions à la fois épithéliales et mésenchymateuses. Les hépatocytes sont ballonnisés et parfois nécrosés en foyers ; ils peuvent se fusionner et donner lieu à des cellules géantes multinucléées. Les cellules de Kupffer sont turgescentes ; il peut exister des thrombi biliaires canaliculaires et capilliculaires. Enfin peuvent se voir des foyers d'hématopoïèse.

Une *atrésie des voies biliaires* est possible (Swan).

4° Les modifications osseuses considérées jusqu'à présent comme rares ont donné lieu à de nombreuses publications récentes, surtout de la part des radiologues.

Elles ne donnent pas de manifestations cliniques ni biologiques, mais sont fréquentes (36 % des cas pour Heggie), reconnues par un examen radiologique systématique.

Elles atteignent surtout les os longs et singulièrement les extrémités inférieures des fémurs et supérieures des tibias.

Sont considérées comme caractéristiques (Singleton et Rudolph) :
— une ligne de calcification métaphysaire floue ;
— une trabéculation grossière avec des zones transparentes ou opaques des diaphyses.

Ces lésions régressent spontanément, plus ou moins rapidement suivant l'état général de l'enfant.

Il peut exister également des zones de calcification irrégulière sur tout le squelette.

Il n'y a pas de périostite.

Ces lésions sont attribuées tantôt à des foyers d'ostéomyélite virale (Lindquist, Plotkin et coll.), tantôt à des facteurs métaboliques (Singleton et Rudolph).

5° Des altérations cardiaques particulières ont été décrites, différentes des malformations classiques.

Ce sont des lésions musculaires, dues à la localisation du virus sur le myocarde, et réalisant l'aspect d'une *myocardite nécrosante*, objectivée histologiquement par une ballonnisation cellulaire.

La fréquence de ces myocardites est difficile à évaluer ; les troubles qu'elles entraînent sont souvent interprétés comme des conséquences hémodynamiques des malformations congénitales, susceptibles d'ailleurs d'être associées.

Parmi ces myocardites :

— certaines entraînent une insuffisance cardiaque avec des signes électriques de nécrose myocardique, rapidement mortelle ;
— d'autres entraînent une insuffisance cardiaque grave, avec également des signes de nécrose myocardique, mais curable par les digitaliques ;
— d'autres n'ont pas de traduction clinique mais donnent, dès la naissance, un tracé électrique évoquant des séquelles d'infarctus.

6° Des manifestations pulmonaires ont été constatées dans 25 % des cas.

Elles sont rebelles au traitement antibiotique et, en fait, difficiles à distinguer des pneumopathies bactériennes.

L'examen anatomique pratiqué dans 2 cas par Korones a montré des lésions de pneumonie interstitielle hypertrophique à partir desquelles le virus a été isolé.

CHAPITRE III

LE VIRUS RUBEOLIQUE

I. — CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES DU VIRUS

Bien que le virus de la rubéole soit isolé depuis 1962, beaucoup d'incertitudes subsistent encore sur sa constitution et des divergences se font jour en ce qui concerne sa classification.

A. — Caractères physiques

1° Le virus a une DENSITÉ faible, de 1,08, d'après les études les plus récentes.

2° Sa TAILLE a été diversement appréciée, de 100 à 300 millimicrons, d'après les essais de filtration à travers des membranes gradacol ou millipore.

En microscopie électronique, le diamètre de la particule virale varie de 50 à 280 millimicrons ; ceci peut tenir au polymorphisme de la particule virale, mais les études les plus récentes font état de chiffres plus bas. Ainsi BEST et BANATVALA, en septembre 1967, évaluent le diamètre du virus à 50-75 millimicrons.

3° Sa MORPHOLOGIE est encore mal connue, et les images obtenues en microscopie électronique ne sont pas satisfaisantes.

Le virus est décrit comme une particule sphérique ou rectangulaire, entourée d'une enveloppe hérissée de spicules de 5 à 6 millimicrons de long qui correspondent probablement à l'hémagglutinine virale. Sa structure interne serait à symétrie hélicoïdale (NORRBY, PHILLIPS, BEST).

Cette morphologie et le fait d'être constitué d'acide ribonucléique l'apparenteraient au sous-groupe des Para-myxovirus, mais des auteurs australiens (HOLMES et WARBURTON) l'ont rapproché récemment des Arbovirus, en raison des caractères de son hémagglutinine.

B. — Sensibilité aux agents physiques et chimiques

La 5-fluoro-2'-déoxyuridine, la 5-iodo-2'-déoxyuridine, le 5-bromo-2'-déoxyuridine n'inhibent pas sa croissance, indiquant qu'il s'agit d'un virus à acide ribonucléique.

Il est en revanche inhibé par la 1-adamantanamine-hydrochloride (Amantadine).

Il est sensible à l'éther, au chloroforme, au formol, au chlorure de caesium, mais résistant au merthiolate, au bisulfite de sodium, aux antibiotiques et antibactériens communément utilisés.

Le virus commence à s'altérer à un pH inférieur à 5,9 et il est complètement détruit à pH 3.

Il peut supporter l'ultrasonication pendant cinq minutes, ou 27 congélations-décongélations successives.

Il est très rapidement inactivé par le rayonnement ultra-violet, mais non son antigène fixant le complément.

Il est aussi très sensible à la chaleur :

— à 37°C, et dans des limites de pH comprises entre 6,8 et 8,1, sa demi-vie n'est que d'une heure ;

— à + 4°C, il est stable pendant une semaine ;

— à — 70°C, il peut être conservé plusieurs années.
En 1963, on a pu isoler le virus à partir de prélèvements datant de 1957 et conservés à — 60°C ;

— la lyophilisation permet une parfaite conservation.

II. — PRELEVEMENTS POUR RECHERCHE DE VIRUS

A. — Produits pathologiques et sécrétions

Les produits pathologiques et les différentes sécrétions de l'homme et des animaux expérimentalement inoculés contiennent le virus, qu'on peut isoler à divers moments déterminés au cours de l'infection.

Pendant longtemps, on crut que seul le singe était réceptif à la maladie. S'il fait quelquefois une maladie cliniquement apparente, mais toujours bénigne, le plus souvent son infection est inapparente, tout comme chez les autres animaux de laboratoire que l'on a pu inoculer : lapin, cobaye, rat, furet, hamster. Tous ces animaux répondent immunologiquement à l'infection virale, et leurs sérums hyperimmunisés sont utilisés pour identifier le virus isolé.

1° Au cours de la rubéole naturelle de l'enfant et de l'adulte (*fig. 1*).

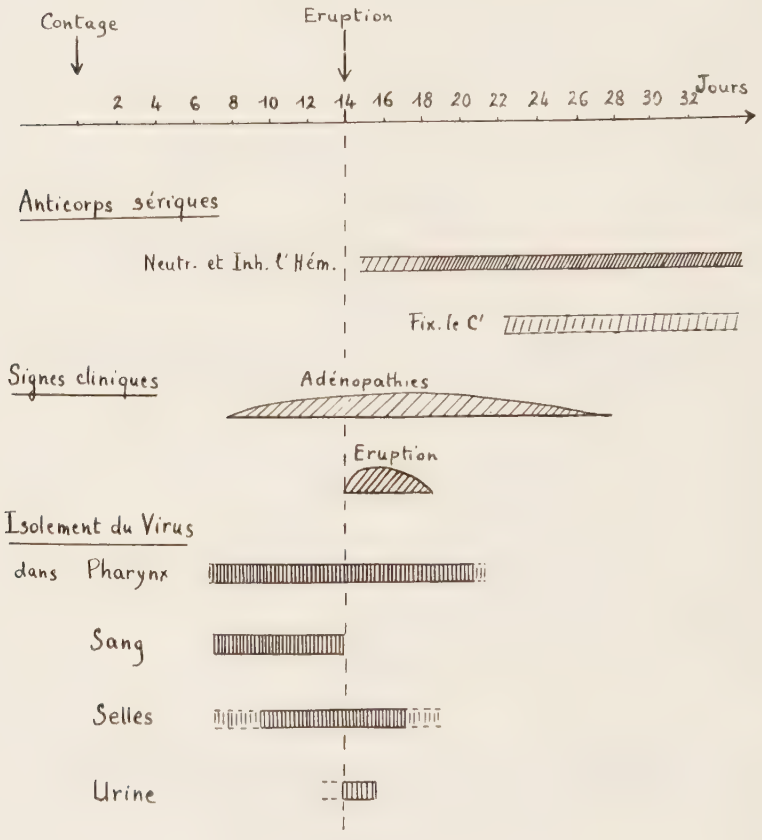

FIGURE 1
Succession des phénomènes cliniques, virologiques et immunologiques au cours de la rubéole typique

On peut isoler le virus une semaine avant les symptômes cliniques, à partir :
— du nasopharynx ;
— du sang total, du sérum ou des leucocytes ;
— de l'urine ;
— des selles.

Pendant environ une semaine après l'éruption, le virus est isolé du nasopharynx ; parfois, il persiste encore pendant un ou deux jours dans l'urine et quelques jours dans les selles ; mais on ne l'isole plus du sang. C'est la période où apparaissent les anticorps circulants.

2° Chez la femme enceinte, le virus a pu être isolé du placenta et du liquide amniotique.

3° Chez l'embryon, le fœtus et le nouveau-né atteints de rubéole congénitale, le virus est retrouvé dans tous les organes où il peut persister très longtemps. Mais il est particulièrement abondant dans le cristallin, et Menser, Harley et coll. rapportent le cas d'un enfant atteint de rubéole congénitale opéré à l'âge de trois ans pour cataracte et chez lequel le virus fut isolé du cristallin. Ces enfants porteurs de virus sont donc dangereux pour leur entourage qu'ils peuvent contaminer.

B. — Conservation des prélèvements

Etant donné que le virus est très rapidement inactivé à la température ordinaire, les prélèvements doivent être conservés à — 70°C s'ils ne sont pas inoculés immédiatement.

C. — Inoculation à des cultures cellulaires

Les prélèvements sont inoculés à des cellules en culture, sans traitement préalable lorsqu'il s'agit de plasma ou de sérum ; les urines seront alcalinisées ; il est préférable d'ajouter des antibiotiques et, pour certains, des antifongiques aux milieux qui recevront les prélèvements de gorge ou les produits d'écouvillonnage rectal.

III. — ISOLEMENT ET CULTURE DU VIRUS

A. — Mise en évidence de la croissance du virus par le phénomène d'interférence

Parkman, Buescher, Artenstein, puis Veronelli et Maassab isolèrent le virus pour la première fois en utilisant cette technique.

1° Principe : Dans un système de cellules en culture, où le virus croît sans effet cytopathogène, sa multiplication engendre un phénomène d'interférence, empêchant la surinfection de ces cellules par un autre virus et inhibant l'effet cytopathogène de ce dernier.

On distingue donc trois temps dans cette réaction délicate :

— l'inoculation sur un système de cellules sensibles du produit d'où l'on cherche à isoler le virus de la rubéole ;

— la révélation de la multiplication du virus sur ce système par interférence avec un autre virus ; et souvent un passage à l'aveugle est nécessaire avant que l'interférence ne puisse se manifester ;

— l'identification de la nature rubéolique du virus par neutralisation spécifique.

2° Réalisation pratique.

a) *Cultures cellulaires :* le premier système cellulaire qui fut utilisé est une culture primaire de cellules de rein de singe d'Afrique, *Cercopithecus aethiops*. Après inoculation de ces cellules et incubation à la température du laboratoire pendant une à deux heures, l'inoculum est remplacé par le milieu de survie, habituellement milieu de Eagle ou de Hanks avec addition de sérum et d'acides aminés.

Les tubes inoculés et les tubes témoins sont laissés à 37°C puis examinés tous les deux jours ; le milieu est changé au bout de quelques jours.

b) *Le virus interférent,* un Entérovirus habituellement, Coxsackie A 9 ou ECHO 11, est ajouté aux tubes ensemencés, du huitième au dixième jour, après passage systématique aveugle ; sa croissance est inhibée par la présence du virus de la rubéole.

c) *L'identification du virus de la rubéole est faite* par neutralisation de cet effet interférent par le sérum d'un animal hyperimmunisé.

3° D'autres systèmes cellulaires ont par la suite été utilisés : il s'agit de lignées continues de rein de singe *M. rhesus* LLC-MK2, obtenues par Hull et utilisées par Hopps, Veronelli et Maassab, ou de *M. cynomolgus* (Lehmann et Ferris), ou encore des souches de cellules de *Cercopithecus aethiops* BSC-1 (Sever, Hopps), ou GMK-AH1 (Günalp).

4° De nombreux autres virus interfèrent avec le virus de la rubéole : Parkman a étudié les modalités d'interférence de différents virus et a obtenu celle-ci avec :

a) *Des Entérovirus :*

— Echovirus 11, mais aussi 4 - 7 - 8 - 21.

— Coxsackie A9, mais aussi B1, B3 et B5.

— Poliovirus I et II.

b) *Des Myxovirus* et des *Paramyxovirus :*
— Influenzae A1.
— Parainfluenzae type 2.
— Oreillons.
— Rougeole.

c) *Le virus SV 40.*

d) *Des Arbovirus :*
— Cache Valley.
— Sindbis.
— Encéphalite équine type Est.

5° La production d'interféron a été prouvée par de nombreux auteurs (Neva et Weller ; Schiff, Sever et Huebner ; Rawls, Desmyter) sur ces systèmes cellulaires. Elle peut influencer la neutralisation indirecte utilisée pour l'identification du virus.

B. — Isolement par observation d'un effet cytopathogène

1° Sur cellules amniotiques humaines : en 1962, Weller et Neva publient leurs premières observations d'un effet cytopathogène déterminé par le virus de la rubéole sur cultures primaires de cellules amniotiques humaines, conservées au moins quarante-cinq jours, sur lesquelles on effectue 2 ou 3 passages.

A l'isolement, les lésions cellulaires apparaissent au trente-troisième jour ; après un passage, elles sont plus précoces, vers le vingtième jour ; parfois les lésions ne sont observées qu'après 3 passages aveugles. Si l'on continue les passages, les lésions cellulaires demeurent inchangées ou diminuent progressivement.

Les cellules, sous l'effet du virus de la rubéole, deviennent réfringentes, ovalaires, se détachent du verre. Le noyau s'estompe. Très souvent la cellule, émettant des pseudopodes clairs, prend un aspect amoeboïde.

Des préparations colorées à l'hématoxyline-éosine objectivent la présence d'inclusions cytoplasmiques éosinophiles, et de masses basophiles nucléaires de dimensions variables.

La présence du virus dans ces cellules est confirmée par l'effet interférent sur le virus Sindbis, et son identification par neutralisation de l'effet cytopathogène par des sérums de référence antirubéole.

Mais cette méthode est très longue, difficilement reproductible, et l'effet cytopathogène d'appréciation délicate.

2° C'est pourquoi d'autres auteurs se sont attachés à mettre au point des systèmes cellulaires où l'effet cytopathogène est plus net, plus caractéristique et surtout plus rapide. Il s'agit de :

a) *Cultures primaires de rein de lapin* (Mc Carthy et Taylor-Robinson) où, dès le quatrième jour après l'inoculation, disparaissent les îlots de type épithélial, alors que les cellules fibroblastiques restent intactes.

Mais l'identification du virus par neutralisation y est très difficile.

b) *Lignée continue GMK-AH1 de rein de Cercopithecus aethiops*, établie par Ann Holloway, utilisée par Günalp. Il faut attendre au moins huit jours pour qu'apparaisse l'effet cytopathogène qui est complet en quinze jours.

Ici encore, on peut observer des inclusions éosinophiles cytoplasmiques.

c) *Surtout deux lignées continues de cellules de lapin :*

— lignée de rein de lapin RK13, établie par Beale et coll. ;
— lignée de cornée de lapin SIRC, établie par Volkert, utilisée par Leerhoy.

— *En cellules RK13* (rabbit kidney), l'effet cytopathogène apparaît du cinquième au septième jour lors de la première culture, du troisième au quatrième jour après passage. Les cellules qui, normalement, sont tassées les unes contre les autres, de même taille, polygonales, deviennent irrégulières, mal limitées, allongées, laissant entre elles des espaces vides et elles se détachent du verre.

On peut obtenir sur cellules RK13 une numération des particules infectieuses par la technique classique des plages :

— soit plages microscopiques (« microfoci ») au bout de trois jours ;
— soit plages macroscopiquement visibles, de 2 à 4 mm de diamètre, entre le cinquième et le septième jour.

Elles permettent aussi un titrage par neutralisation, le titre du sérum étant apprécié par la réduction de 50 % du nombre des plages.

— *En cellules SIRC* (serum institute rabbit cornea), l'effet cytopathogène apparaît dès le quatrième jour, est important le septième jour, total ou presque entre le neuvième et le dixième jour.

Il y a d'abord vacuolisation du cytoplasme aux pôles de la cellule, puis arrondissement du noyau qui devient plus dense. Le cytoplasme se rétracte ensuite et contient de fines particules sombres.

C. — Les cultures du virus après isolement

1° L'adaptation des souches virales isolées à la lignée cellulaire BHK-21 (rein de hamster nouveau-né), établies par Stoker et Mc Pherson, est particulièrement utile.

a) Le clone WI-2 de cellules BHK-21 donne un effet cytopathogène rapide ; on peut obtenir des plages petites mais distinctes en cinq à six jours.

b) Le clone 13 de cellules BHK-21 permet la culture du virus en suspension à un titre élevé ; il est utilisé pour la production de l'hémagglutinine virale.

2° Mais surtout on a cultivé le virus sur des cellules qui se multiplient en restant chroniquement infectées et sans donner d'effet cytopathogène, par exemple les *cultures primaires embryonnaires* de divers organes de mammifères.

L'étude de la croissance et des effets du virus sur des *cellules diploïdes embryonnaires humaines* est particulièrement intéressante. Elle a été menée par Boué, Plotkin et ses collaborateurs, et projette une lumière nouvelle sur la genèse des malformations de la rubéole congénitale.

Les anomalies expérimentalement observées dépendent de l'origine du tissu embryonnaire mis en culture.

a) Dans les cultures réalisées à partir de la *peau*, le virus présent à un titre de 10^4/ml ne détermine aucune modification morphologiquement visible ; mais une étude du *caryotype* montre que le pourcentage des métaphases avec une ou plusieurs cassures nettes atteint 20 à 25 % deux semaines après l'inoculation du virus et se maintiendra plusieurs mois à ce taux, alors que les souches cellulaires témoins n'en comportent que 5 à 10 %.

Rawls et Melnick ont observé les mêmes phénomènes dans des organes provenant d'autopsies d'enfants atteints de rubéole congénitale.

b) Surtout, dans des cultures cellulaires provenant de poumons de hamster, la présence du virus détermine rapidement une diminution de l'index mitotique, et a même parfois une action inhibitrice totale de la division.

Plotkin et Vaheri ont démontré la présence d'une substance protéique capable d'inhiber la croissance, qui n'est pas l'interféron, mais semble être un constituant cellulaire normalement réprimé.

Ceci permet de comprendre :

— d'une part l'*action tératogène* du virus : les cellules ne meurent pas, mais restent sur place sans se diviser, empêchant donc leur remplacement par des cellules saines ;

— d'autre part *le faible poids de naissance*, avec diminution du poids moyen de chaque organe, dans lequel on note une raréfaction cellulaire (Naeye et Blanc ; Töndury).

IV. — PRODUCTION DE L'HEMAGGLUTININE VIRALE

A. — Difficulté de la mise en évidence du pouvoir hémagglutinant du virus

En 1966, Parkman, Meyer et Artenstein mettent en évidence le pouvoir hémagglutinant du virus.

Rappelons, à ce propos, que le terme « hémagglutinine » est impropre, le suffixe « ine » désignant habituellement un anticorps, alors qu'ici, hémagglutinine signifie antigène hémagglutinant.

Pourquoi avait-il été si difficile d'objectiver le pouvoir hémagglutinant du virus ?

Trois raisons peuvent être invoquées :

a) Tout d'abord, il existe dans les sérums, de quelque origine qu'ils soient, des inhibiteurs de l'hémagglutination, et en particulier dans les sérums de veau utilisés à la concentration de 10 % dans les milieux d'entretien des cultures cellulaires.

b) En second lieu, la production d'hémagglutinine dépend en grande partie du titre du virus et de la bonne adaptation de la souche virale aux cultures cellulaires.

c) Enfin, l'hémagglutination ne se produit qu'avec des hématies de poussin de moins de vingt-quatre heures, de pigeon adulte, et à un moindre degré d'oie adulte.

B. — Obtention de l'hémagglutinine

1° Toutes les souches virales semblent convenir, mais l'inoculum doit toujours être de titre élevé.

Sont utilisées les souches :

— RV (Sever ; Fuccillo et coll. ; Gitnick ; Vincent ; Auletta et coll.) ;

— West Point (Field ; Vandervelde et coll.);
— ML et M33 (Stewart ; Parkman ; Hopps et coll.).

2° Les hématies utilisées étaient initialement des hématies de poussin de moins de vingt-quatre heures ou d'oie adulte, mais celles-ci donnaient de moins bons résultats.

Peetermans et Huygelen ont montré qu'avec des hématies de pigeon adulte l'hémagglutination était strictement comparable à celle que l'on obtenait avec des hématies de poussin de moins de 24 heures.

Holmes et Warburton comparent à cet égard le virus de la rubéole aux Arbovirus.

3° Les cultures cellulaires utilisées : Stewart, Parkman et leurs collaborateurs cultivent les souches de virus M33 et ML sur le clone WI-2 de cellules BHK-21, isolé par Mc Pherson et Montagnier. Ce sont des fibroblastes allongés, formant facilement une couche monocellulaire, cultivés à 35°C dans des flacons de 90 ml contenant du milieu de Eagle avec 10 % de sérum de veau, de la glutamine et des antibiotiques. Après avoir enlevé le milieu, on introduit 5 à 10 ml d'un inoculum contenant 10^6 à $10^{7,5}$ DICT 50 de virus (Doses Infectieuses 50 % en Cultures de Tissu) qui sera laissé au contact des cellules pendant trois heures à 35°C ; puis on ajoute 40 ml de milieu de Eagle contenant 2 % de sérum de veau inactivé et traité par le kaolin. De cette façon, les inhibiteurs non spécifiques de l'hémagglutinine sont supprimés. Il existe d'autres produits éliminant ces inhibiteurs non spécifiques de l'hémagglutinine, tels que l'héparine et le chlorure de manganèse employés notamment pour les Réovirus.

Le maximum du titre hémagglutinant se situe entre la vingt-quatrième et la quarante-huitième heure ; celui du titre infectieux qui est de $10^{5,5}$ à $10^{7,5}$ DICT 50 pour 0,1 ml, entre la quarante-huitième et la quatre-vingt-seizième heure.

Les milieux contenant l'antigène sont maintenus à + 4°C pendant leur traitement, puis le stockage se fait à — 70°C.

4° Des perfectionnements techniques permirent par la suite d'obtenir une hémagglutinine à titre plus élevé.

a) Tout d'abord le traitement par le *tween-éther,* selon la technique que Norrby avait utilisée pour l'hémagglutinine de la rougeole, rend l'antigène plus stable, de titre plus élevé, et de surcroît non infectieux.

b) Puis Gitnick, Vincent, Auletta et coll. ont montré, après Vaheri, Sedwick et Plotkin, tout l'intérêt des cultures de cellules

BHK21 en suspension. Ils utilisent *le clone 13S*, dérivé du clone 13 de Stoker et Mc Pherson. Les cellules sont de courts fibroblastes, dont la faible adhérence au verre permet facilement leur culture en suspension.

La densité cellulaire atteint $5 . 10^5$ à 1,5 ou $2 . 10^6$ cellules par millilitre en moins de deux jours, et le virus a un titre de 10^7 à $10^{7,5}$ U.F.P. par ml (Unités Formant Plages), dans les surnageants récoltés cinquante à soixante-dix heures après l'inoculation.

Plusieurs passages du virus sur BHK 21 entraînent une désadaptation du virus aux cellules AGMK, mais non aux cellules RK 13.

Plusieurs passages en RK 13 permettent une bonne croissance en BHK 21, alors qu'après passages sur AGMK le virus croît toujours sur RK 13 mais non plus sur BHK 21.

Il est donc fondamental d'utiliser, pour obtenir une hémagglutinine de titre élevé, un virus bien adapté au système cellulaire employé, et d'adsorber les inhibiteurs non spécifiques de l'hémagglutination.

L'adsorption est possible par le kaolin.

Mais Furukawa, Plotkin, Sedwick et Profeta, en étudiant la nature de l'hémagglutinine, ont montré qu'on pouvait obtenir celle-ci en cultivant le virus dans un milieu contenant du sérum de veau à 10 %, à condition d'y ajouter de l'EDTA. Le mécanisme d'action de l'EDTA semble être une adsorption des cations qui peuvent lier l'inhibiteur au virus.

C. — Nature de l'hémagglutinine

L'hémagglutinine n'est pas un antigène soluble. Elle est associée au virus infectieux et sédimentable.

Elle est bien conservée à — 70°C, mais très sensible aux variations de température, elle est rapidement inactivée lorsque celle-ci dépasse 0°.

Peetermans, Huygelen et Bouillet ont montré que la lyophilisation lui conférait une stabilité remarquable sans perte de titre : les réactions d'inhibition de l'hémagglutination faites sur 120 sérums humains et animaux avec 4 unités hémagglutinantes de l'antigène lyophilisé et non lyophilisé ont donné des résultats strictement comparables. Mais surtout, la lyophilisation permet le stockage à moindre température. Ainsi, des travaux effectués sur un lot d'antigène récent ont montré que le titre hémagglutinant reste stable pendant un délai de huit jours à + 40°C suivi d'un traitement de deux heures à + 65°C.

V. — SOUCHES VIRALES ATTENUEES VACCINANTES

A. — Généralités

1° L'élaboration d'un vaccin a virus inactivé s'est avérée très difficile ; le virus se multiplie assez mal sur les systèmes cellulaires utilisables : le titre ne dépasse pas 10^7 unités virales par millilitre sur souches de cellules diploïdes humaines et $10^{5,5}$ dans les cellules primaires de singe ou de lapin ; ce titre est insuffisant pour obtenir l'antigénicité indispensable.

2° Les souches virales atténuées utilisées comme vaccins doivent, elles, répondre à un certain nombre d'exigences concernant leur innocuité et leur efficacité :

— absence de réactions secondaires ;
— absence de contagiosité du virus excrété par le sujet vacciné, qui ne doit pas contaminer les personnes à son contact, parmi lesquelles pourraient se trouver des femmes enceintes ;
— activité antigénique ;
— immunité durable, pouvant protéger une femme vaccinée pendant toute la période de fécondité ;
— absence de virus latent dans les systèmes cellulaires servant à la préparation. L'on sait en effet, que les cellules de singe Cercopithèque hébergent spontanément de nombreux virus dont certains sont oncogènes pour d'autres animaux ; leur effet nocif n'a cependant encore jamais été prouvé chez l'homme, mais on ne saurait être trop prudent à cet égard.

B. — Les vaccins déjà expérimentés

La réaction d'inhibition de l'hémagglutination a permis lors des essais des différents vaccins, de contrôler leur efficacité par l'apparition des anticorps chez les sujets séronégatifs.

1°) *La souche HPV 77* (high passage virus 77), mise au point par Parkman et Meyer après culture des souches virales M 33 et ML sur cellules de rein de singe Cercopithèque GMK et ayant subi soixante-dix-sept passages sur ces mêmes cellules, a pris des propriétés nouvelles par rapport aux souches sauvages.

L'effet cytopathogène apparaît plus vite sur cellules RK 13 et la production d'interféron par les cellules est multipliée par quatre.

Les essais pratiqués avec ce vaccin, par PARKMAN et son équipe aux Etats-Unis et par BOUÉ et Madame CELERS en France, montrent qu'il satisfait aux exigences demandées à un vaccin :

— pas de symptôme clinique ;

— pas de contamination des personnes en contact, ceci pouvant être expliqué par le fait que la souche atténuée présente une affinité moindre pour la muqueuse naso-pharyngée et est excrétée à un moindre degré par cette voie.

— ascension du titre des anticorps neutralisants et inhibant l'hémagglutination qui, pendant les quelques mois de cette expérience encore forcément limitée dans le temps, s'est montrée régulière et constante.

Ultérieurement, cette souche a été adaptée à d'autres systèmes cellulaires (fibroblastes d'embryon de canard et cellules rénales de chien).

2°) En cultivant la souche virale RA 27/3, sur la lignée diploïde WI-38 de fibroblastes humains, PLOTKIN et ses collaborateurs ont obtenu du 21e au 23e passage une souche virale atténuée, donnant une montée satisfaisante du titre d'anticorps neutralisants et inhibant l'hémagglutination.

L'atténuation est obtenue plus facilement en incubant à 30°C qu'à 35°C.

Les auteurs insistent, d'autre part, sur l'intérêt de cultiver le virus sur cellules humaines, évitant ainsi les contaminations par des virus simiens latents.

3°) PEETERMANS et HUYGELEN ont obtenu la souche atténuée Cendehill, par passages du virus de la rubéole sur cultures primaires de cellules de rein de lapin.

Le virus atténué présente des caractéristiques biologiques particulières qui le distinguent du virus sauvage :

In vitro :

a) La souche atténuée présente un effet cytopathogène précoce sur cellules primaires de rein de lapin.

b) Elle produit un effet cytopathogène sur cellules RK 13 et induit dans ce système cellulaire des plages virales caractéristiques.

c) La production d'interféron est fortement augmentée par rapport à celle du virus sauvage.

In vivo :

a) La souche atténuée ne se montre plus antigénique pour le lapin après inoculation sous-cutanée à dose élevée.

b) La souche atténuée, inoculée au singe, est faiblement antigénique : environ 50 % des animaux forment des anticorps.

c) La souche atténuée, administrée au singe par voie nasale, ne provoque aucune formation d'anticorps, contrairement au virus sauvage.

d) La souche atténuée a également perdu tout pouvoir infectieux pour la muqueuse naso-pharyngée humaine. L'administration nasale de virus à dose élevée ne provoque pas de séroconversion. Par contre, le virus atténué se montre antigénique pour l'homme après inoculation sous-cutanée.

Les nombreux essais cliniques effectués tant chez l'enfant que chez l'adulte, ont démontré l'efficacité et l'innocuité de ce vaccin :

— Tous les sujets susceptibles, vaccinés, forment des anticorps et un titre élevé se maintient tout au long d'une période d'observation actuellement de dix-huit mois.

— Aucune réaction clinique n'a été observée après vaccination.

— Les sujets susceptibles témoins, gardés en contact intime avec les vaccinés, ne montrent aucun signe sérologique d'infection. Cette absence de dissémination s'explique vraisemblablement par le faible degré d'excrétion du virus par le vacciné, et par la perte d'infectivité du virus atténué pour la muqueuse naso-pharyngée.

Ainsi, les souches virales atténuées semblent actuellement répondre aux critères que l'on est en droit d'exiger d'un vaccin antirubéole. Il faudra cependant un recul suffisant pour juger de la durée de l'immunité acquise afin de préciser éventuellement la fréquence des injections de rappel. Il faut, en effet, que la protection soit parfaite, tant il serait grave de donner, dans ce domaine, une fausse sécurité, en particulier chez les femmes enceintes hantées par les risques de l'embryopathie rubéolique.

CHAPITRE IV

SEROLOGIE DE LA RUBEOLE AVANT L'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION

I. — L'IMMUNOFLUORESCENCE

La mise en évidence des anticorps par immunofluorescence directe (ESTELA) s'est révélée très difficile, aussi la technique d'immunofluorescence indirecte est-elle seule utilisée.

A. — Principe de l'immunofluorescence indirecte

Il s'agit de révéler les anticorps du sérum humain étudié déposé sur des cellules porteuses du virus de la rubéole, par un sérum antiglobuline humaine conjugué à un fluorochrome, l'examen étant fait en lumière ultra-violette.

B. — Les résultats

BROWN, MAASSAB, VERONELLI et FRANCIS ont utilisé une lignée continue de rein de singe *M. rhesus*, LLC-MK2, chroniquement infectée par la souche virale R.A.

Sur 7 cas de rubéole diagnostiquée cliniquement, moins de quarante-huit heures après l'éruption, toutes les réactions étaient négatives sauf une.

Un mois après, toutes les réactions étaient positives avec des titres allant du 1/8^{e} au 1/32^{e}.

Deux enfants normaux de sept mois présentaient des réactions négatives.

LENNETTE, WOODIE et SCHMIDT utilisent la lignée BSC-1 de rein de *Cercopithecus aethiops* infectée par la souche virale RV. Ils obtiennent une plus grande sensibilité.

Mais la lecture est d'appréciation délicate, la fluorescence d'ailleurs semble diminuer rapidement dans les mois suivant l'infection.

Cette technique est donc difficilement utilisable en pratique courante et ne permet pas des études épidémiologiques.

II. — LA NEUTRALISATION

La séro-neutralisation, elle aussi, est une technique délicate, de reproductibilité difficile, et qui ne peut être pratiquée que dans un laboratoire spécialisé.

On peut employer :

— soit la *méthode indirecte*, utilisant l'interférence ;

— soit la *méthode directe*, utilisant l'effet cytopathogène.

De plus, a été proposée une technique de neutralisation appréciée par la suppression des plages d'hémadsorption obtenues avec un virus interférent hémadsorbant de titre connu ; elle n'est pas utilisée en pratique courante.

A. — Méthode indirecte ou d'interférence

1° Principe : on observe la neutralisation par les anticorps contenus dans le sérum étudié, du pouvoir interférant d'une dose connue de virus de la rubéole envers un virus surinfectant.

2° Réalisation : une suspension de virus rubéole contenant entre 30 et 100 DI 50 (doses infectieuses 50 %) est laissée en contact un certain temps avec des dilutions successives de sérum.

Puis on inocule des cellules sensibles avec le mélange. Quelques jours après, on ajoute le virus interférent. Celui-ci produit son propre effet cytopathogène jusqu'à une certaine dilution du sérum qui exprime le titre en anticorps neutralisants. Le virus de la rubéole en effet, neutralisé par les anticorps sériques, ne s'est pas multiplié, permettant ainsi au virus surinfectant de croître.

Les systèmes les plus utilisés sont :

— les cellules diploïdes humaines et le virus Sindbis (Boué ; Deshayes ; Plotkin) ;

— les cellules de *Cercopithecus aethiops* et le virus ECHO 11 (Parkman ; Plotkin) ;

— mais on a utilisé aussi : la lignée RK 13, les cellules LLC-MK2, BSC-1 avec le virus ECHO 11 (Parkman ; Plotkin), ou des cellules de Cercopithèque avec le virus Coxsackie A9 (Sever et coll. ; Schiff et coll. ; Mc Carthy et coll.).

3° Résultats :

a) Lors de la *rubéole de l'enfant et de l'adulte,* les anticorps neutralisants apparaissent dès le deuxième-troisième jour de l'éruption et croissent rapidement pour atteindre leur titre maximum un mois après. Ils persistent ensuite pendant des années à un titre moins élevé ; leur recherche permet donc un diagnostic rétrospectif et leur présence témoigne toujours d'une immunité solide vis-à-vis de la rubéole.

b) Dans la *rubéole congénitale,* les anticorps présents à la naissance dans le sérum des nouveau-nés persistent quelques mois : ce sont les anticorps maternels transmis. Puis l'enfant synthétise ses propres anticorps.

4° Ses inconvénients : la technique doit être extrêmement rigoureuse, car des facteurs de variations sont dus :
— au jour choisi pour l'addition du virus interférent ;
— à la dose de virus rubéolique utilisée ;
— à la présence d'anticorps contre le virus interférent, s'il s'agit de virus ECHO 11 ou Coxsackie. Il faut donc toujours tester les sérums vis-à-vis de ces virus ;
— à l'addition de sérum frais de lapin ;
— à la production d'interféron par les cellules.

Mais surtout, le long délai exigé pour réaliser la neutralisation ne permet pas de diagnostic rapide.

B. — Méthode directe par suppression de l'effet cytopathogène

1° Principe : l'effet cytopathogène du virus rubéolique observé sur les cellules amniotiques humaines, sur les cellules RK 13 ou SIRC est neutralisé par les anticorps contenus dans le sérum testé à des dilutions successives.

2° Réalisation :

a) Les *cellules amniotiques humaines* ont été utilisées par Weller, Alford et Neva, en employant 30 à 300 DICT 50 de virus rubéolique, et en gardant les tubes inoculés de dix-huit à vingt-huit jours.

b) Sur lignée continue RK 13 (Mc Carthy, Taylor-Robinson et Pillinger ; Dudgeon, Butler et Plotkin), ou sur lignée SIRC (Leerhoy ; Phillips, Melnick et Burkhardt), la lecture est plus rapide (cinq à sept jours).

3° Les résultats sont identiques à ceux que l'on obtient avec la méthode indirecte, mais avec une moindre sensibilité.

4° Les inconvénients tiennent aux faits suivants :

— la dose de virus à utiliser doit être faible, et le titre est donc difficilement reproductible ;
— l'effet cytopathogène est d'appréciation délicate ;
— les cellules en lignée sont susceptibles de variations imprévisibles.

C'est pourquoi différents chercheurs, afin de réaliser une réaction sérologique plus simple, se sont efforcés de mettre au point un antigène fixant le complément.

III. — FIXATION DU COMPLEMENT

L'antigène fixant le complément s'est avéré de préparation extrêmement difficile, de réalisation coûteuse et de signification encore imprécise.

Les anticorps mis en évidence par ce moyen ne sont pas superposables aux anticorps neutralisants, aux anticorps fluorescents ni aux anticorps inhibant l'hémagglutination.

A. — Préparation de l'antigène

En 1965, Sever, Huebner et coll. obtinrent un antigène fixant le complément lié aux cellules infectées par le virus rubéolique, par centrifugation de cultures cellulaires en lignée continue RK 13, deux jours après leur inoculation par la souche de virus RV, et en cellules primaires de rein de *Cercopithecus aethiops* en sept à dix jours.

Puis ces mêmes auteurs, à la suite de Schell et Wong, préparèrent l'antigène à partir de cellules BHK 21 inoculées.

Stern utilise aussi les cellules LLC-MK2 chroniquement infectées par le virus.

Il s'agit donc, en somme, d'une purée cellulaire. Un antigène soluble a pu être obtenu à partir du surnageant de ces cultures cellulaires, après concentration.

Furent utilisées les cellules RK 13 (1966, Schmidt et Lennette), GMK-AH1 (1966, Veronelli et Eckert), et surtout BHK-21, qui sont un excellent système cellulaire pour l'obtention de l'antigène fixant le complément (1967, Schmidt, Lennette et coll.).

B. — Résultats

Les anticorps fixant le complément apparaissent plus tardivement que les autres anticorps, plusieurs jours après l'éruption ; leur titre est toujours bas et ils ne persistent pas très longtemps ; la décroissance commence environ quinze mois après la maladie.

Cette réaction est d'une bonne spécificité, mais peu sensible et elle ne permet pas de porter un diagnostic rétrospectif ; elle est donc inutilisable dans les enquêtes épidémiologiques.

Elle serait cependant intéressante pour apprécier la séroconversion, lorsque n'a pas été réalisé le prélèvement du sérum précoce dans le cours de la maladie. En effet, les anticorps apparaissant plus tardivement, l'ascension du titre d'anticorps pourrait ainsi être appréciée.

Malheureusement, dans un certain nombre de cas de rubéole confirmée, ces anticorps sont absents.

CHAPITRE V

L'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION DE LA RUBEOLE

I. — PRINCIPE DU TEST D'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION

Dans toutes les infections dont le virus responsable est producteur d'hémagglutinine, il est possible de titrer les anticorps selon une réaction d'inhibition de l'hémagglutination.

Cette méthode a été appliquée pour la première fois par HIRST, en 1941, au séro-diagnostic de la grippe, puis à d'autres virus, et en particulier au virus morbilleux dont l'hémagglutinine a été démontrée par PÉRIÈS et CHANY.

L'infection par ces virus porteurs d'un antigène hémagglutinant à leur surface suscite la formation, chez le sujet atteint, d'anticorps sériques qui, en présence de l'hémagglutinine, se lient à elle, formant un complexe antigène-anticorps spécifique.

Le même phénomène a lieu *in vitro ;* si l'on ajoute à ce complexe antigène-anticorps une suspension d'hématies sensibles, possédant les récepteurs de l'hémagglutinine, leur hémagglutination ne se produira pas, les sites hémagglutinants viraux ayant été bloqués par les anticorps sériques.

L'inhibition de l'hémagglutination témoigne donc de la présence dans le sérum d'anticorps.

Lorsque l'on fait la réaction avec des dilutions successives de sérum et une quantité constante d'hémagglutinine et de globules rouges sensibles, la plus haute dilution entraînant encore une inhibition de l'hémagglutination exprime le titre d'anticorps présents dans le sérum testé.

Lorsque le sérum ne contient pas d'anticorps, les globules rouges sont hémagglutinés.

II. — TECHNIQUES D'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION DE LA RUBEOLE DEJA DECRITES

A. — Généralités

Toutes les techniques accordent une importance fondamentale au temps de préparation des sérums étudiés.

Ce temps a pour but :

— d'éliminer les agglutinines spontanées, en les adsorbant par une suspension à forte concentration des hématies utilisées ;

— d'éliminer les inhibiteurs non spécifiques de l'hémagglutination, en les adsorbant par du kaolin.

Mais il existe des divergences dans les modalités pratiques de la réaction, concernant :

— le ou les diluants utilisés ;

— la durée et l'ordre des adsorptions ;

— le type d'hématies utilisées ;

— la température de la réaction.

Nous rappellerons les techniques employées par les différents auteurs, puis nous décrirons les modalités pratiques de la réaction, telle que nous l'avons pratiquée au Laboratoire Central de l'Hôpital Claude-Bernard.

B. — Technique originale de Stewart, Parkman, Hopps, Douglas, Hamilton et Meyer

1° Matériel :

a) *L'hémagglutinine* est préparée sur cellules BHK-21, clone WI-2, inoculées avec les souches de virus rubéolique ML et M33. Le milieu d'entretien contient 2 % de sérum de veau inactivé par la chaleur et traité par le kaolin. Elle est stockée à — 70°C.

b) *Les globules rouges* de poussin de moins de vingt-quatre heures sont lavés trois fois, en suspension à 0,16 % dans du tampon Dextrose-Gélatine-Véronal, à pH 7,3 et contenant 0,2 % d'albumine bovine.

c) *Les sérums* sont adsorbés :

— d'abord par une suspension à 0,25 % de kaolin lavé à l'acide selon la technique préconisée par Clarke et Casals pour les Arbovirus, pendant au moins une heure ;

— puis par une suspension à 50 % de globules rouges de poussin de moins de vingt-quatre heures.

d) *Les différentes dilutions* sont faites dans le tampon Dextrose-Gélatine-Véronal (D.G.V.).

2° Technique :

On utilise une *microméthode,* où tous les éléments de la réaction sont distribués sous un volume de 0,025 ml dans des plaques à godets en U.

a) *Titrage de l'hémagglutinine :* on met en présence des dilutions de 2 en 2 de l'hémagglutinine dans le tampon à pH 7,3 sous un volume de 0,025 ml, et 0,025 ml d'une suspension de globules rouges de poussin à 0,16 %, pendant une heure à une heure et demie, à la température de + 4°C.

L'hémagglutinine est utilisée dans la réaction sous un volume de 0,025 ml contenant 4 unités hémagglutinantes.

b) *Inhibition de l'hémagglutination :* à des dilutions de 2 en 2 du sérum adsorbé, on ajoute 0,025 ml d'antigène contenant 4 unités hémagglutinantes ; on laisse incuber quinze minutes à 36°C.

Puis on ajoute 0,025 ml de globules rouges de poussin à 0,16 % et on laisse une heure à une heure et demie au frigidaire.

On procède ensuite à la lecture.

On teste en même temps un sérum témoin positif, un sérum témoin négatif et on fait des témoins sérum et globules rouges.

C. — Technique de Gitnik, Vincent, Auletta, Ley, Tzan et Sever

1° Matériel :

a) *L'hémagglutinine* est préparée sur cellules BHK 21, clone 13, inoculées avec la souche virale RV, en croissance dans du milieu de Eagle contenant 10 % de sérum fœtal de bovidé traité par le kaolin.

b) *Le diluant* utilisé est le tampon Dextrose-Gélatine-Véronal (D.G.V.).

c) *Les globules rouges* sont des globules rouges de poussin de moins de vingt-quatre heures, à jeun ; ils sont lavés trois fois et mis en suspension à 50 % dans du D.G.V.

d) *Les sérums* subissent trois traitements :

— adsorption par une suspension de kaolin lavé à l'acide à 25 % dans du D.G.V. : on laisse vingt minutes à la température de la pièce 0,2 ml de sérum, 0,2 ml de D.G.V. et 0,2 ml de kaolin, puis on centrifuge pendant vingt minutes à + 4°C ;
— adsorption par les hématies : on ajoute au surnageant 0,05 ml de globules rouges à 50 % dans du D.G.V. ; on laisse pendant la nuit à + 4°C, puis on centrifuge à + 4°C ;
— décomplémentation pendant trente minutes à + 56°C.

2° Technique :

La réaction est effectuée en *microméthode*, sous des volumes de 0,025 ml.

L'incubation de l'antigène (4 unités hémagglutinantes) et des dilutions de sérum dans le D.G.V. se font pendant une heure à la température du laboratoire.

Puis on ajoute les globules rouges de poussin à 0,16 % dans le D.G.V. et on laisse pendant la nuit à + 4°C.

On procède ensuite à la lecture.

On incorpore dans la réaction les témoins habituels (sérum positif, sérum négatif, témoins sérum et globules rouges).

D. — Technique de Field et Vandervelde (Londres) et de Thompson et Hutchinson (Manchester)

1° Matériel :

a) *L'hémagglutinine* est obtenue par culture de la souche virale de rubéole West Point, sur cellules BHK 21. Elle est traitée par le tween 80 et l'éther.

b) *Les globules rouges* utilisés sont des hématies de poussin à 0,25 % dans du D.G.V. dans la macrométhode, et à 0,16 % dans la microméthode.

c) *Les sérums* sont adsorbés par une suspension de kaolin à 25 % pendant une heure à la température du laboratoire ; puis après centrifugation, par une suspension à 50 % dans du D.G.V. de globules rouges de poussin pendant deux heures à + 4°C.

d) Les sérums sont ensuite inactivés pendant trente minutes à + 56°C.

2° Technique :

a) *Macrométhode* (Manchester) : à des dilutions de 2 en 2 du sérum sous un volume de 0,1 ml, on ajoute 0,1 ml d'antigène contenant 4 unités hémagglutinantes. Après une heure d'incubation à la température du laboratoire, on ajoute 0.1 ml de la suspension d'hématies à 0,25 %. Puis on réfrigère pendant trois heures, et on fait la lecture.

b) *Microméthode* (Londres) : elle se fait de la même manière, mais en utilisant tous les réactifs sous un volume de 0,025 ml, et la suspension d'hématies de poussin à 0,16 %.

Les témoins habituels sont inclus dans chaque série.

E. — Technique de Boué, Nicolas et Lang

1° Matériel :

a) *L'hémagglutinine* est préparée en flacons stationnaires ou tournants sur cellules BHK 21, clone 13, ensemencées avec 5 à 10 ml d'une suspension virale dont le titre est supérieur à $10^{6,5}$ DICT 50 par millilitre. Le milieu d'entretien est le milieu de Eagle ou de Stoker.

Le milieu est récolté à partir du troisième ou quatrième jour et à nouveau les sixième et septième jour, mais le titre hémagglutinant est alors moindre.

La conservation de l'antigène se fait à — 70°C.

b) *Les hématies utilisées* sont des hématies de poussin de vingt-quatre heures, lavées dans du D.G.V.

c) *Les sérums subissent un traitement spécial :*

— d'abord *adsorption par le kaolin.*

Le sérum est dilué au 1/5e dans le tampon boraté à pH 9, puis on ajoute un volume égal de kaolin lavé à l'acide à 25 % dans le tampon boraté à pH 9.

On laisse en contact vingt minutes à la température du laboratoire ; puis on centrifuge pendant trente minutes à 2.000 tours par minute ;

— puis *traitement par les hématies de poulet.*

Sans remettre en suspension le kaolin, on ajoute 0,1 ml d'une suspension d'hématies de poussin ou de poulet adulte à 50 % dans un tampon à pH 6,2.

On laisse à 0° pendant vingt minutes en agitant deux ou trois fois, puis on centrifuge à + 4°C pendant dix minutes.

On décante, et la dilution finale obtenue du sérum est de 1/10e.

2° Technique :

La réaction est faite :

— soit en macrométhode, sous un volume de 0,2 ml ;
— soit en microméthode, sous un volume de 0,05 ml, sur des plaques à alvéoles réfrigérées à l'avance et maintenues à 0°.

a) Titrage de l'antigène :

— en macrométhode : à des dilutions de 2 en 2 de l'antigène dans une solution d'albumine bovine faite dans le tampon boraté à pH 9, sous un volume de 0,2 ml, on ajoute 0,2 ml de globules rouges de poussin à 0,25 % dans le tampon à pH 6,2. On laisse une heure et demie à 0°, puis on effectue la lecture ;
— en microméthode : les dilutions d'antigène se font sous un volume de 0,1 ml, et la suspension d'hématies est à 0,16 %.

b) La réaction d'inhibition de l'hémagglutination :

— en macrométhode : dilutions de sérum sous un volume de 0,2 ml ; hématies de poussin à 0,25 % ;
— en microméthode : dilutions de sérum sous un volume de 0,05 ml ; hématies de poussin à 0,16 %.

Les dilutions de sérums traités, utilisés de préférence un à deux jours après leur traitement, sont faites dans le tampon boraté à pH 9 jusqu'à une dilution de 1/2.560e.

On ajoute 4 unités hémagglutinantes d'antigène (0,2 ml dans la macrométhode, 0,05 ml dans la microméthode). On laisse en contact pendant deux heures, les plaques étant recouvertes.

Les hématies sont ensuite ajoutées. On laisse sur la paillasse trente minutes à deux heures.

Des témoins sérum, antigène et globules rouges sont inclus dans la réaction ; on titre aussi simultanément un sérum de référence positif et un sérum négatif. On vérifie l'adsorption correcte des inhibiteurs non spécifiques des sérums en pratiquant la réaction avec l'hémagglutinine du virus Sindbis (8 unités hémagglutinantes). En effet, l'homme ne possède pas d'anticorps pour ce virus animal.

F. — Technique de Peetermans et Huygelen

1° Matériel :

a) L'hémagglutinine est produite sur la lignée continue BHK-21, et traitée par le Tween 80 et l'éther. Lyophilisée, elle est conservée à + 4°C.

b) *Les globules rouges* utilisés sont les hématies de pigeon adulte.

Peetermans et Huygelen ont montré en effet que le titre hémagglutinant est le même avec des hématies de poussin de vingt-quatre heures ou des hématies de pigeon adulte.

c) *L'adsorption* des sérums se fait dans l'ordre suivant :

— adsorption par une suspension d'hématies à 50 % à + 4°C pendant une heure, puis centrifugation et recueil du surnageant. On emploie 0,1 ml de cette suspension d'hématies pour 0,2 ml de sérum ;

— adsorption par une suspension à 25 % de kaolin lavé à l'acide, à la température ordinaire pendant une demi-heure. On emploie 1,1 ml de cette suspension de kaolin pour 0,2 ml de sérum.

d) *Le diluant* est le tampon D.G.V. pour toutes les dilutions.

2° Technique :

A 0,2 ml de dilution croissante de sérum, on ajoute 4 unités hémagglutinantes d'antigène sous un volume de 0,2 ml.

Après incubation à la température ordinaire pendant une heure, on ajoute 0,2 ml d'une suspension à 0,25 % d'hématies de pigeon et on laisse pendant une heure à + 4°C.

La lecture est faite ensuite.

Dans chaque test, on incorpore un sérum témoin positif, un sérum témoin négatif et un témoin de chaque sérum à tester.

CHAPITRE VI

PRATIQUE DE LA REACTION D'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION EN MILIEU HOSPITALIER

I. — TECHNIQUE DE LA REACTION D'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION

A. — Réactifs

1° Solution tampon dextrose-gélatine-véronal ou D.G.V. :

Cette solution sera utilisée comme diluant à tous les temps de la réaction proprement dite.

Elle est ainsi préparée :

a) Dissoudre dans 250 ml d'eau distillée au bain-marie à 37° C, les produits suivants :

— Barbital	0,58 g
— Barbital sodique	0,38 g
— Gélatine	0,60 g

b) Ajouter un par un :

— $CaCl_2$ anhydre	0,02 g
— $MgSO_4$, 7 H_2O	0,12 g
— NaCl	8,5 g
— Dextrose	10 g
— Eau distillée q.s.p.	1.000 ml

c) Stériliser à l'autoclave à dix minutes à 115°C.

d) Le pH doit être exactement à 7,2, et vérifié à chaque manipulation.

2° Solution de Alsever

a) Composition :

— Glucose anhydre	20,5 g
— Citrate trisodique	8 g
— Acide citrique	0,55 g
— NaCl	4,2 g
— Eau bidistillée q.s.p.	1.000 ml

b) Le pH doit être à 6,1 ; l'ajuster au besoin avec une solution à 5 % d'acide citrique.

c) Stériliser par filtration sur membrane Millipore GS (0,22 μ).

d) Le sang est prélevé sur la solution d'Alsever qui est anticoagulante, à volume égal.

Le sang total se conserve ainsi au moins quinze jours à + 4°C et jusqu'à deux mois en l'absence de contamination.

Avant l'emploi des hématies, il faut les laver trois fois dans le D.G.V.

3° Solution tampon P.B.S. (Phosphate-Buffered-Saline) :

a) On prépare séparément quatre solutions :

Solution A :

Dissoudre un par un dans une fiole jaugée de 5 litres, avec un agitateur magnétique :

— NaCl	40 g
— KCl	1 g
— PO_3Na_2H anhydre	5,75 g
— PO_4KH_2	1 g
— Eau bidistillée q.s.p.	1.000 ml

Solution B :

Dans une fiole de 1 litre, dissoudre :

— $CaCl_2$	0,5 g
— Eau bidistillée q.s.p.	700 ml

Solution C :

Dans une fiole de 1 litre, mettre :

— $MgCl_2$, 6 H_2O	0,5 g
— Eau bidistillée q.s.p.	700 ml

Solution D :

— Eau bidistillée	500 ml

b) Autoclaver séparément les quatre solutions et après refroidissement à + 4°C, pour éviter une précipitation, verser lentement la solution C dans la solution A, puis la solution B. Compléter à 5 litres avec la solution D.

Il est possible aussi de mélanger, ainsi qu'il est indiqué, les quatre solutions, puis de stériliser le mélange par filtration sur membrane Millipore GS (0,22 μ).

c) Cette solution est utilisée pour le traitement du kaolin.

4° Suspension a 25 % de kaolin dans le tampon P.B.S. :

On utilise du kaolin lavé à l'acide*.

1) Mélanger le kaolin lavé à l'acide et le P.B.S. dans les proportions suivantes :

	par 20 ml	par litre
Kaolin traité à l'acide	5 g	250 g
Solution P.B.S. q.s.p.	20 ml	1.000 ml

2) Laisser décanter, ou centrifuger pendant dix minutes, à 2.000 tours/minute. Enlever le surnageant.

3) Remplacer le liquide décanté par un égal volume de solution P.B.S. et remettre en suspension.

4) Renouveler quatre fois la centrifugation et la remise en suspension dans le P.B.S.

5) Vérifier si le pH du liquide surnageant est bien de 7.

6) La suspension obtenue est conditionnée en flacons de verre neutre ou traité.

Boucher au moyen d'un bouchon type butyl et capsuler.

7) Stériliser pendant une heure à 120°C. Le kaolin peut être ainsi conservé plusieurs mois.

8) Pour la pratique du test, on prélève la quantité nécessaire de la suspension de kaolin ; on la centrifuge et on remplace extemporanément la quantité de tampon phosphate surnageant par un volume égal de la solution de D.G.V. et on vérifie le pH.

Ainsi préparée, cette suspension définitive de kaolin à 25 % doit être conservée à + 4°C.

(*) Kaolin Acid-Washed Hopkin-Williams, fourni par les Laboratoires Biotrol, 3, rue de Béarn, Paris-3e.

5° Suspension de globules rouges * :

a) Le sang de pigeons adultes, recueilli dans un volume égal de solution d'Alsever, peut être conservé à + 4°C pendant une semaine environ.

b) Au moment de l'emploi, la quantité nécessaire de suspension sang-Alsever est diluée dans 10 volumes de D.G.V., puis centrifugée pendant dix minutes à 2.000 tours/minute.

En partant du culot d'hématies, on répète deux fois la même opération, toujours avec du D.G.V.

Après la troisième centrifugation, on prépare une suspension à 50 % d'hématies dans le D.G.V., qui servira de suspension-mère.

c) Pour la pratique du test, on utilise une suspension à 0,25 % d'hématies dans du D.G.V. (la suspension est à 0,16 % dans la microméthode).

d) Il est préférable d'employer chaque jour des hématies fraîchement centrifugées et lavées.

6° Antigène hémagglutinant ** :

Il est préparé selon la méthode de Peetermans et Huygelen, inactivé par le tween-éther, conservé par lyophilisation, reconstitué avec de l'eau distillée au moment de son emploi.

7° Sérum positif de référence :

Un sérum positif de référence est inclus dans toutes les réactions ; il a un titre de 128 unités hémagglutinantes. C'est un sérum humain prélevé chez une femme ayant fait une rubéole clinique dix ans auparavant, au cours d'une épidémie familiale.

B. — Conduite de la réaction

Il n'y a rien de particulier au sujet du prélèvement de sang, recueilli dans un tube stérile, sans anticoagulant. Après formation du caillot, le sérum est décanté et conservé à + 4°C. Les échantillons de sérums peuvent être conservés plusieurs mois à — 30°C ; il est ainsi possible de faire une étude comparative et simultanée de plusieurs sérums d'un même malade.

(*) Ces hématies sont fournies par les Laboratoires Sorga, 28, avenue Corentin-Celton, Paris-19e.

(**) Il nous a été fourni par les Laboratoires Recherche et Industrie Thérapeutiques (R.I.T.), 10, rue du Plâtre, Paris-4e.

1° Traitement des sérums :

Absolument *indispensable*, le traitement des sérums comprend successivement :

— un temps d'adsorption par les globules rouges de pigeon à 50 %, afin d'éliminer les iso-agglutinines anti-pigeon ;

— un temps d'adsorption par le kaolin, ainsi que l'avaient préconisé Clarke et Casals dans la sérologie des *Arbovirus*, afin d'éliminer les inhibiteurs non spécifiques de l'hémagglutination.

Ces deux temps éliminent ainsi les réactions faussement négatives ou positives.

Il semble préférable de commencer l'adsorption par les globules rouges plutôt que par le kaolin (Peetermans-Huygelen). Le laboratoire du National Institute of Health (Bethesda) signale d'ailleurs que, dans certains sérums, persistent des inhibiteurs de l'hémagglutination non spécifiques après traitement au kaolin, suivi de l'adsorption par les hématies ; l'inversion de l'ordre d'adsorption fait disparaître ces inhibiteurs.

La préparation des sérums sera ainsi conduite :

a) Mélanger 0,2 ml de sérum et 0,2 ml de D.G.V. à 0,05 ml de la suspension d'hématies de pigeon à 50 %.

b) Centrifuger pendant dix minutes à 2.000 tours/minute à + 4°C et recueillir le surnageant.

c) Ajouter à ce surnageant 1,2 ml de la suspension de kaolin à 25 %. Agiter énergiquement et laisser pendant trente minutes à température ordinaire, en agitant de temps en temps.

d) Agiter pour remettre en suspension et centrifuger dix minutes à 2.000 tours/minute.

e) Recueillir le surnageant et l'inactiver en le portant à la température de 56°C pendant trente minutes.

Le liquide recueilli correspond à une dilution de 1/8e du sérum ; il peut être dès lors utilisé pour la réaction d'inhibition de l'hémagglutination ; mais il n'y a aucun inconvénient à le conserver un ou deux jours à + 4°C ou à le stocker plusieurs jours à — 30°C.

Des variantes dans les temps de préparation des sérums sont possibles.

1) L'adsorption au contact des globules rouges de pigeon peut être prolongée sans aucun inconvénient ; on peut la pratiquer avec 0,1 ml de globules rouges à 50 %, ce qui donne plus de sécurité quant à l'élimination des agglutinines naturelles antipigeon.

2) Depuis peu, nous procédons sur les conseils du Docteur PEETERMANS à l'inactivation des sérums avant leur traitement, dans le but d'éviter l'hémolyse qui se produisait parfois lors de l'adjonction des hématies.

2° TITRAGE DE L'ANTIGÈNE :

Méthode :

Le titrage de l'hémagglutinine est réalisé le jour de son emploi.

Il est effectué sur des plaques à godets pour hémagglutination.

a) Faire une dilution initiale de l'antigène au 1/4 dans le D.G.V. Répartir ensuite dans 8 godets 0,2 ml de D.G.V. et mettre 0,2 ml de de la dilution au 1/4 dans le premier godet. A partir de ce mélange, faire des dilutions de 2 en 2, jusqu'au godet n° 7, dont on jette 0,2 ml et qui est à une dilution de 1/512e. Le godet n° 8 représente le témoin globules rouges, contrôlant l'absence de leur agglutination spontanée.

b) Mettre 0,2 ml de D.G.V. dans chaque godet, puis 0,2 ml d'une suspension de globules rouges de pigeon adulte à 0,25 %. Agiter. Laisser en contact au moins une heure à + 4°C.

N° des godets	1	2	3	4	5	6	7	8 témoin G.R.
Antigène au 1/4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2 → 0,2 rejeté	0
D.G.V.	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
D.G.V.	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Globules rouges à 0,25 %	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Résultats :

Une unité hémagglutinante est contenue dans la dernière dilution qui produit une hémagglutination complète.

L'antigène, dans la réaction d'inhibition de l'hémagglutination, doit être utilisé à une dilution contenant 4 unités hémagglutinantes sous un volume de 0,2 ml.

3° RÉACTION D'INHIBITION DE L'HÉMAGGLUTINATION :

Méthode :

Les réactions d'hémagglutination sont effectuées dans des plaques en acrylic de 145 × 180 mm creusées de 80 cavités semi-sphériques

de 16 mm de diamètre. Ces plaques doivent être lavées très soigneusement et rincées à l'eau distillée.

Tous les réactifs sont utilisés sous un volume de 0,2 ml.

L'antigène contient 4 unités hémagglutinantes sous un volume de 0,2 ml.

Les dilutions de sérums sont faites à l'aide d'un rhéomètre du 1/8e au 1/4.096e ; les autres éléments de la réaction sont distribués avec des seringues automatiques à répartition continue.

	Témoin sérum	Sérum testé									
N° des godets		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sérum au 1/8	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2 rejeté
D.G.V.	0,2	0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Dilution du sérum		1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
Antigène (4 U. hém.)	0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Laisser en contact 1 heure à la température ordinaire

Hématies à 0,25 %	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Laisser en contact 1 heure à + 4°

Des *contrôles* sont faits systématiquement :

a) Du sérum :

L'antigène est remplacé par 0,2 ml de D.G.V.

Ce contrôle doit vérifier l'absence d'hémagglutination et prouver ainsi que toutes les agglutinines naturelles antipigeon ont bien été éliminées.

b) De l'antigène :

On mélange 0,2 ml de l'antigène utilisé dans la réaction et 0,2 ml d'une dilution au 1/2, 1/4, 1/8e, 1/16e, 1/32e de l'antigène dans du D.G.V., avec 0,2 ml de D.G.V. qui remplace le sérum, et on ajoute 0,2 ml de globules rouges.

Il y a hémagglutination dans les trois premiers godets.

On vérifie ainsi que l'antigène a été utilisé à une dilution correspondant bien à 4 unités hémagglutinantes.

c) Des hématies et de la solution de D.G.V. :

On mélange 0,4 ml de D.G.V. et 0,2 ml de globules rouges.

L'absence d'hémagglutination confirme le bon état des hématies.

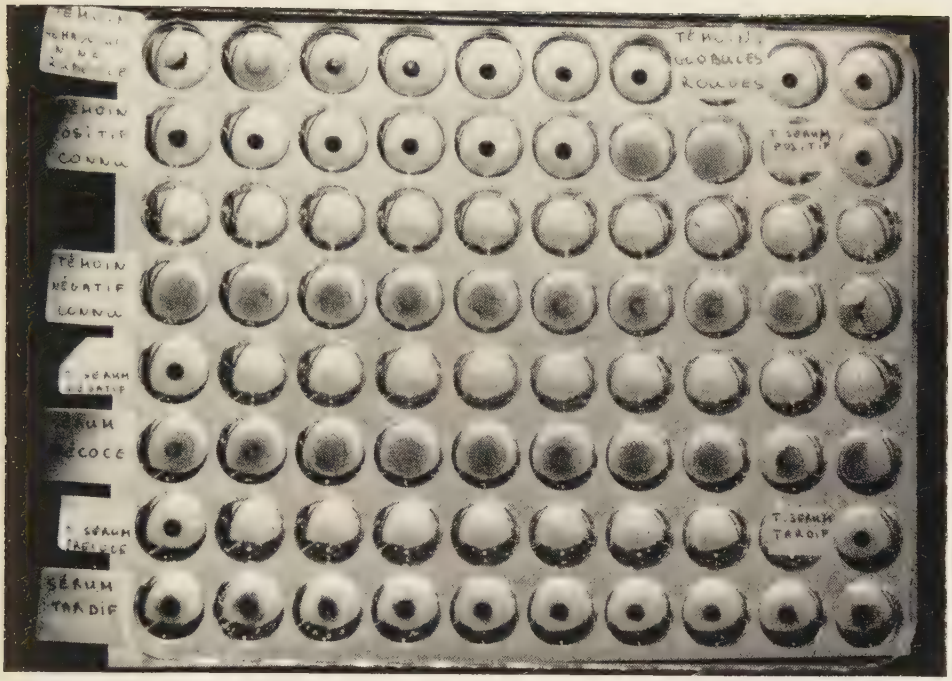

FIGURE 2
PLAQUE D'HEMAGGLUINATION

La plaque comporte 8 rangées de 10 godets chacune.

Première rangée (rangée supérieure sur la photographie) :
— Les 7 premiers godets représentent le « témoin hémagglutinine » (dilutions de 2 en 2 de l'antigène). Dans les 3 premiers godets contenant respectivement 4 unités, 2 unités et 1 unité hémagglutinante, il y a hémagglutination. Les 4 godets suivants sont sédimentés sans hémagglutination, puisqu'ils contiennent moins de 1 unité hémagglutinante. — Les 2 derniers godets n'ont pas reçu d'hémagglutinine ; les hématies sont sédimentées. Ce sont les « témoins globules rouges ».

Deuxième rangée : titrage du sérum de référence à titre connu dans les 8 premiers godets. Ce sérum inhibe l'hémagglutination dans les 6 premières dilutions. Il a donc un titre de 1/256e. Le dernier godet est le « témoin sérum ». La sédimentation des hématies prouve que les agglutinines antipigeon ont toutes été sédimentées.

La *troisième rangée* de godets est vide.

Quatrième rangée : sérum de titre $<$ 1/8e. Les hématies de tous les godets sont hémagglutinées.

Cinquième rangée : le premier godet est le témoin sérum correspondant.

Sixième rangée : elle correspond à un sérum précoce prélevé au premier jour d'une éruption de rubéole : il est de titre $<$ 1/8e.

Septième rangée : le premier godet contient le témoin sérum précoce, le dernier godet le témoin sérum tardif.

Huitième rangée : elle correspond au sérum tardif du même malade prélevé au dixième jour ; il inhibe l'hémagglutination dans les 9 premiers godets : il a donc un titre de 1/2.048e.

Lecture (*fig. 2*) :

— *Hémagglutination :* les hématies agglutinées se présentent comme un réseau aux limites floues.

— *Inhibition d'hémagglutination :* les hématies sédimentées forment une pastille bien ronde, dense, aux limites précises.

Un sérum est considéré comme négatif, ne contenant pas d'anticorps, lorsque l'hémagglutination se produit pour toutes les dilutions. Le titre est donc inférieur à 1/8e.

Le titre d'un sérum positif est donné par la plus forte dilution entraînant une inhibition nette de l'hémagglutination.

Parfois, lorsque les agglutinines non spécifiques d'un sérum positif ne sont pas entièrement éliminées par les hématies de pigeon à 50 %, le sérum peut paraître faussement négatif ; ou encore il se produit un phénomène de zone, comportant une hémagglutination non spécifique dans les premières dilutions, puis une inhibition de l'hémagglutination dans les dilutions suivantes.

Mais le témoin est alors toujours hémagglutiné.

En pratique, dans ce cas, il faut réadsorber le sérum avec les hématies de pigeon.

II. — AUTRES EXAMENS VIROLOGIQUES PRATIQUÉS

1° Le test d'inhibition de l'hémagglutination de la rougeole est pratiqué selon les mêmes principes, mais :

a) Le diluant est l'eau physiologique, car un pH compris entre 4,5 et 10,1 n'influence pas l'agglutinine du virus morbilleux.

b) Les hématies sont des hématies de babouins ou de singe *rhesus*, lavées trois fois dans l'eau physiologique, puis mises en suspension à 0,5 % dans le même soluté.

c) L'antigène hémagglutinant est préparé au Laboratoire de Virologie de l'Hôpital Claude-Bernard sur cellules rénales de singe, en lignée continue BSC ou Ma 104, inoculées avec la souche Edmonston de virus rougeoleux, que nous devons à l'obligeance du Professeur Chany. Les réactions sont pratiquées avec 4 unités hémagglutinantes.

d) La dilution de départ du sérum traité est de 1/5e, et la réaction antigène-anticorps se fait à la température du laboratoire pendant une heure après distribution de la suspension d'hématies de singe. Puis les plaques sont incubées à 37°C pendant une heure.

e) Là encore, les témoins hémagglutinants, les témoins hématies, les témoins sérums sont inclus dans chaque réaction, ainsi qu'un sérum de référence à titre connu.

2° Des isolements de virus à partir de prélèvements de gorge, de selles, dans les premiers jours des éruptions, ont été tentés sur deux sortes de cellules en culture : cellules rénales de singe et cellules amniotiques humaines.

Le liquide céphalo-rachidien a été inoculé à une portée de souriceaux nouveau-nés lorsque des signes méningés avaient indiqué la ponction lombaire.

III. — RESULTATS

A. — Matériel d'étude

Nous avons pratiqué la réaction d'inhibition de l'hémagglutination de la rubéole sur 800 sérums, afin soit de préciser le diagnostic d'une éruption, soit d'évaluer le niveau immunitaire d'une population donnée.

La répartition des sérums est la suivante :

— 259 sérums proviennent de malades atteints d'exanthème fébrile, hospitalisés à l'Hôpital Claude-Bernard.

— 375 sérums proviennent de femmes enceintes ayant consulté dans les Maternités de l'Hôpital Beaujon et de l'Hôpital de l'Hôtel-Dieu.

— 66 sérums proviennent du personnel féminin hospitalier (Hôpital Beaujon et Hôpital de l'Hôtel-Dieu).

— 73 sérums proviennent de sujets d'âges divers dont l'examen était demandé à titre systématique.

— 27 sérums proviennent d'enfants présentant des manifestations cliniques qui pouvaient faire penser à une rubéole congénitale.

B. — Diagnostic des exanthèmes fébriles

Chez 159 sujets hospitalisés à l'Hôpital Claude-Bernard pour des éruptions fébriles de types divers, morbilliformes, scarlatiniformes ou rubéoliformes, nous avons étudié *259 sérums :*

— 100 paires de sérums, prélevés chez 100 malades, l'un au début de l'éruption, l'autre à la convalescence.

— 59 sérums isolés ; dans ces cas, nous n'avons obtenu qu'un seul sérum, soit préccce, soit tardif, mais nous avons pu cependant en tirer parfois des conclusions diagnostiques.

Des recherches complémentaires furent faites parallèlement à la sérologie de la rubéole, sur les 100 paires de sérums :

a) Les anticorps de la rougeole ont été systématiquement recherchés par inhibition de l'hémagglutination selon la technique de Chany et Périès.

b) Des isolements de virus, à partir de prélèvements de gorge et de selles, furent tentés chez 55 malades.

Lorsqu'un virus était isolé, le titrage des anticorps contre le virus a été pratiqué sur les deux sérums, précoce et tardif.

C'est ainsi que l'on a pu (*Tableau I*) :
— dans 28 cas, établir avec certitude le diagnostic de rubéole en cours ;
— dans 17 cas, affirmer le diagnostic de rougeole en cours ;
— dans 14 cas sur 55 recherches, isoler un virus, avec un titre élevé d'anticorps dans 7 cas.

Tableau I

	Nombre de sujets	Nombre de sérums
RUBEOLE	28	56
ROUGEOLE	17	34
RECHERCHE DE VIRUS	55	110

1° Les rubéoles en cours : les rubéoles en cours ont été diagnostiquées avec certitude dans 28 cas, par l'ascension significative du titre des anticorps dans deux échantillons de sérum, prélevés l'un dans les premiers jours de l'éruption, l'autre à la convalescence.

Le *Tableau II* illustre l'ascension du titre des anticorps en fonction du nombre de jours écoulés depuis le début de l'éruption. Nous avons également noté le chiffre de plasmocytes observé chez 27 sujets, ainsi que le titre des anticorps morbilleux.

Tableau II : *Etude de 28 cas de rubéole confirmée :* Ascension du titre d'anticorps en fonction du nombre de jours écoulés après le début de l'éruption, et titrage sur les mêmes sérums des anticorps inhibant l'hémagglutination de la rougeole.

des sérums		sanguine	jours après l'éruption															(inhibition de l'hémagglutination)	
			1	2	3	4	5	8	9	10	11	12	13	14	15	21	31		
67261	21 ans	5 %		< 8				>128										épuisé	épuisé
671269	36 ans	2 %	< 8											2048				20	20
671326	19 ans	2 %			32								2048					320	320
68148	22 ans	0 %			64								≥4096					épuisé	5
681266	22 ans	3 %			16										1024			80	80
671228	30 ans	3 %		8												512		épuisé	80
671305	22 ans	3 %		64						2048								160	320
68186	26 ans	2 %		< 8													2048	épuisé	80
68861	21 ans	3 %			8			512										80	160
67552	3 ans	0 %			64									≥2048				-	-
67559	3 ans ½	0 %				512					2048							-	-
67591	4 ans ½	2 %				8						512						-	-
67772	5 ans	5 %	< 8			256		1024										80	640
671022	3 ans	9 %		8					≥4096									< 5	< 5
671077	4 ans	12 %					256					≥4096						160	160
671302	10 ans	0 %			256							≥4096						80	80
671360	4 ans	3 %		256													≥4096	160	160
671377	4 ans	1 %		8						1024								80	80
671408	2 ans	0 %		8											2048			< 5	< 5
6833	10 ans	0 %		< 8							≥4096							40	40
6865	5 ans	0 %		< 8										2048				< 5	< 5
68141	18 mois	1 %		16										4096				< 5	< 5
671079	6 ans	4 %		< 8					≥4096									épuisé	< 5
68219	7 ans	0 %		< 8												4096		5	10
68238	5 ans	13 %			64										≥4096			80	160
68301	7 ans	0 %	8												≥4096			10	10
68357	6 ans	4 %				128										1024		160	160
671412	17 mois	-		8										2048				5	5

De cette étude, *plusieurs constatations s'imposent :*

a) L'apparition des anticorps inhibant l'hémagglutination est précoce au cours de l'infection rubéolique.

Elle se fait habituellement dès le deuxième jour de l'éruption, parfois même le premier jour ; mais elle peut être aussi plus tardive.

Ainsi, parmi les 13 sérums testés le deuxième jour de l'éruption, 5 n'ont pas encore d'anticorps, mais les autres en possèdent, dont l'un déjà au titre de 1/256e. En revanche, dans un autre cas, il n'existe pas encore, le quatrième jour, d'anticorps décelables par notre technique.

b) L'ascension du titre des anticorps inhibant l'hémagglutination est extrêmement brutale.

Caractéristique, elle est toujours observée, si le sérum « tardif » est prélevé huit à dix jours après l'éruption.

Les titres sont toujours élevés, atteignant au moins 1/512e, souvent égaux ou supérieurs à 1/4.096e.

c) Le titre des *anticorps inhibant l'hémagglutinine de la rougeole,* apprécié parallèlement chaque fois que nous avons eu assez de sérum, s'est révélé stable pour les deux sérums successifs dans toutes ces éruptions identifiées comme des rubéoles, à l'exception d'un seul cas dont nous discuterons plus loin la signification.

Les titres étaient :

— soit inférieurs au 1/5e, dans 6 cas concernant de jeunes enfants de dix-sept mois à cinq ans qui n'avaient pas encore eu la rougeole ;

— soit plus élevés, mais stables, témoignant d'une immunité acquise lors d'une infection antérieure par le virus morbilleux, titre non influencé par la rubéole en cours.

Cependant, chez un enfant de cinq ans atteint de rubéole cliniquement typique, avec 5 % de plasmocytes, un titre d'anticorps rubéoliques inférieur au 1 8e le premier jour de l'éruption, puis égal au 1 256e le quatrième jour et au 1/1.024e le huitième jour, nous avons constaté la montée des anticorps inhibant l'hémagglutinine de la rougeole de 1 80e à 1 640e. Il serait intéressant, par la suite, de vérifier si de tels phénomènes se reproduisent avec une certaine fréquence. Il semble bien qu'on puisse exclure de façon certaine une communauté antigénique entre les deux virus. On peut alors penser qu'il s'agit là d'un phénomène de rappel, soit non spécifique, soit spécifique après réinfection morbilleuse au contact fortuit d'une rougeole authentique, au cours de l'hospitalisation.

d) *La formule sanguine*, pratiquée dans 27 cas, n'a montré que 5 fois un pourcentage de plasmocytes égal ou supérieur à 5, soit dans environ 1/5e des cas ; dans 2 cas seulement, il était supérieur à 10. Nous notons 9 fois, soit dans 1/3 des cas, qu'il n'y a pas de plasmocytes circulants. Dans les 13 autres cas, la plasmocytose sanguine est comprise entre 1 et 4 %.

Cet argument, pourtant classique, de diagnostic a donc bien peu de valeur, puisque la plasmocytose a été nulle dans 1/3 des cas et peu significative dans 13 cas sur 27.

Des chiffres plus élevés se voient d'ailleurs au cours d'autres éruptions qui ne sont ni des rougeoles, ni des rubéoles.

Ceci met encore l'accent sur l'intérêt d'un diagnostic sérologique fidèle et rapide de la rubéole.

2° Les rougeoles vérifiées : chez 17 enfants âgés de cinq mois à huit ans présentant une éruption d'origine discutable, nous avons pu formellement éliminer le diagnostic de rubéole et affirmer celui de rougeole.

L'ensemble des résultats obtenus chez ces enfants est résumé dans le *Tableau III*.

On remarquera les faits suivants :

a) *L'apparition des anticorps inhibant l'hémagglutination de la rougeole est très précoce*, se faisant le premier ou le deuxième jour de l'éruption.

Ainsi, un enfant (sérum n° 67.896) a un titre de 1/80e le deuxième jour, et un enfant (sérum n° 671.215) un titre de 1/160e le troisième jour.

b) *L'ascension du titre des anticorps inhibant l'hémagglutinine de la rougeole* est rapide et significative dès le dixième jour suivant le début de l'éruption ; mais les titres atteints sont dans l'ensemble moins élevés que les titres obtenus pour la rubéole. Ils varient de 1/160e à 1/2.560e.

c) *La plasmocytose sanguine*, recherchée dans 15 cas, était absente 10 fois. Elle n'a jamais dépassé 4 %.

d) *La réaction d'inhibition de l'hémagglutination de la rubéole* a montré :

— l'absence d'anticorps chez 11 sujets âgés de cinq mois à cinq ans, par conséquent réceptifs à la rubéole. L'évolution de la rougeole n'a pas modifié le titre des anticorps contre la rubéole décelés par la technique d'inhibition de l'hémagglutination, qui sont toujours restés inférieurs au 1/8e ;

TABLEAU III : *Séro-diagnostic de la rougeole par inhibition de l'hémagglutination* et titrage sur les mêmes sérums des *anticorps inhibant l'hémagglutination de la rubéole*

Numéros des sérums	Sujets	Age	Plasmocytose sanguine	SERO - DIAGNOSTIC de la ROUGEOLE (inhibition de l'hémagglutination) jours après l'éruption															SERO - DIAGNOSTIC de la RUBEOLE (inhibition de l'hémagglutination)	
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
671314	D.A.	18 mois	0										160					1280	< 8	< 8
671282	G.G.	2 ans ½	3 %						80									320	< 8	< 8
671146	C.P.	4 ans	0 %					160								640			< 8	< 8
671215	D.D.	5 mois	-			160											320		<8	<8
67988	T.Z.	3 ans ½	0 %			<5										320			<8	<8
671043	B.L.	3 ans	0 %		20										80				<8	<8
671031	C.O.	19 mois	0 %				<5								20				<8	<8
671176	G.T.	3 ans	0 %				40									160			<8	<8
67896	F.F.	18 mois	1 %		80								320						<8	<8
67898	B.L.	5 ans	0 %						320						1280				< 8	< 8
67769	B.V.	3 ans	0 %		20										640				128	128
67859	B.JP.	3 ans ½	0 %	40							640								256	256
67841	G.Cl.	8 ans	-		20												>2560		512	512
67681	B.Fr.	7 ans	4 %				<5											320	512	256
671398	L.LM.	3 ans ½	0 %		40													320	256	256
671166	L.JL.	6 ans	4 %				80										320		1024	2048
671150	M.A.	5 ans	1 %		<5													320	< 8	< 8

— la présence d'anticorps inhibant l'hémagglutinine de la rubéole chez 6 sujets âgés de trois ans à huit ans. Ces anticorps, décelés dans le premier échantillon de sérum à un titre variant de 1/128e à 1/1.024e, ont été retrouvés au même titre dans le deuxième échantillon.

Ces enfants étaient donc immunisés vis-à-vis de la rubéole, bien que ce ne soit pas la règle de contracter la rubéole avant la rougeole. Leur taux d'anticorps était stable, aucune montée n'étant observée.

On peut donc conclure que la rougeole ne modifie pas les résultats de la sérologie de la rubéole.

3° Les cas qui ne sont ni des rougeoles ni des rubéoles, dans lesquels des virus ont été isolés.

Le diagnostic clinique de la rubéole est, on le sait, fort délicat puisque beaucoup de virus sont responsables d'exanthèmes rubéoliformes. Certes, les entérovirus sont le plus souvent incriminés, mais les épidémies saisonnières ou les cas sporadiques surviennent de préférence à l'automne, alors que la rubéole est une maladie de l'hiver, du printemps et du début de l'été. Les adénovirus, les réovirus et les myxovirus peuvent aussi être responsables d'exanthèmes.

Dans 55 cas, des isolements de virus ont été tentés à partir de la gorge et des selles de sujets présentant un exanthème soit morbilliforme, soit scarlatiniforme, soit rubéoliforme, et s'accompagnant parfois d'énanthème ; deux nourrissons étaient atteints de purpura thrombopénique. La plasmocytose sanguine n'est pas rare dans ce groupe.

Les résultats obtenus figurent dans le *Tableau IV*.

Des virus ont été isolés chez 14 malades, 13 enfants et 1 adulte, le cas de cet adulte étant d'ailleurs un peu particulier. Parmi les 13 enfants, 10 d'entre eux, âgés de dix mois à quatre ans, ne possédaient aucun anticorps contre la rubéole ; 3 d'entre eux, âgés de un an et demi, deux ans et demi et trois ans, possédaient des anticorps inhibant l'hémagglutinine de la rubéole à un titre élevé (1/1.024e et 1/2.048e) et stable.

Les virus isolés étaient :

— 11 fois, des virus ECHO ;

— 3 fois, des adénovirus ;

— 1 fois, le virus ourlien.

Mais peut-on, en toute certitude, établir la relation de cause à effet entre l'infection virale et l'exanthème ? L'isolement d'entérovirus dans les selles d'enfants bien portants est un fait courant. Seul, un titre élevé d'anticorps ou l'ascension des anticorps neutralisant le virus

TABLEAU IV : Isolement de virus de la gorge ou des selles avec titrage des anticorps correspondants sur les sérums précoces et tardifs

Numéros des sérums	Sujets	Age	Plasmocytose sanguine	ROUGEOLE		RUBEOLE		Prélèvement de gorge (isolement de virus)	Sérum précoce	Sérum tardif	Selles (isolement de virus)	Sérum précoce	Sérum tardif
671081	C.J.	2 ans	0 %	40	40	< 8	< 8	0			ECHO	1/10	1/160
671300	D.T.	20 mois	-	160	160	< 8	< 8	0			ECHO	1/10	1/40
671374	M.JL.	3 ans	-	< 5	< 5	1024	1024	0			ECHO	< 1/10	1/20
67662	E.C.	3 ans ½	3 %	épuisé	épuisé	< 8	< 8	0			ECHO	< 1/10	1/20
671181	B.N.	2 ans ½	-	80	160	< 8	< 8	0			ECHO	1/320	1/320
67655	D.JM.	10 mois	6 %	épuisé	épuisé	< 8	< 8	0			ECHO	< 1/10	< 1/10
67961	H.P.	2 ans ½	0 %	40	40	2048 (7è jour)	2048	0			ECHO	< 1/10	< 1/10
67628	M.D.	3 mois	5 %	épuisé	épuisé	< 8	< 8	0			ECHO		1/10
671405	X.E.	4 ans	-	20	20	< 8	< 8	0			entéro-virus		
67739	D.v.	18 mois	-	épuisé	épuisé	< 8	< 8	0			adéno-virus	< 1/2	1/8
67651	M.MC.	14 mois	0 %	épuisé	épuisé	< 8	< 8	adéno-virus	épuisé	épuisé	ECHO	< 1/10	1/10
671305	L.G.	22 ans	3 %	160	160	64 (1er jour)	2048 (10è jour)	ECHO	1/40	1/320	-		
671323	H.A.	1 an ½	5 %	< 5	< 5	512	1024	ECHO	1/10	1/10			
68346	C.M.	3 ans	-	< 5	< 5	< 8	< 8	virus ourlien	< 4	16	adéno-virus	32	64

isolé plaide en faveur d'une infection récente. Ce titre élevé ou cette ascension d'anticorps ont été observés chez 8 malades. On peut vraisemblablement, dans ces cas, attribuer au virus isolé un rôle dans l'éruption.

4° Remarques : cependant l'observation fréquente d'infections virales doubles atténue encore cette affirmation.

Au cours de cette étude, nous avons pu démontrer 3 cas d'infections virales doubles, dont voici le détail :

— dans un cas, un entérovirus fut isolé des selles et un adénovirus de la gorge, sans qu'aucun des deux puisse être incriminé à coup sûr dans l'éruption observée ;
— dans un autre cas, il s'agissait d'une double infection par les oreillons et un adénovirus ;
— enfin, le troisième cas concerne un adulte de vingt-deux ans : il s'agissait de rubéole et d'un virus ECHO isolé dans le prélèvement de gorge.

Ce jeune homme présentait une éruption scarlatiniforme avec énanthème du voile, accompagnée d'une plasmocytose à 3 %. Son titre d'anticorps inhibant l'hémagglutinine de la rubéole est passé de 1/64e au deuxième jour de l'éruption à 1/2.048e au dixième jour, alors que son titre d'anticorps antirougeole restait stable à 1/160e. Dans le même temps cependant, il élaborait des anticorps neutralisant la souche de virus ECHO isolée de sa gorge, et le taux de ces derniers passait du 1/40e au 1/320e.

Le virus ECHO donnant exceptionnellement des éruptions chez l'adulte, nous avons considéré que l'éruption était, en définitive, d'origine rubéolique ; mais ce cas est un bel exemple d'infection virale double, parfaitement intriquée.

5° Les cas difficilement interprétables. du fait du titrage d'un seul sérum, chez 59 enfants hospitalisés pour éruption, et pour lesquels nous n'avons jamais réussi à obtenir de sérum tardif.

Malgré tout, dans 14 cas, il nous a été possible d'éliminer de façon formelle le diagnostic de rubéole en cours. En effet ces sérums, prélevés après le cinquième jour de l'éruption, avaient un titre inférieur au 1/8e.

Dans 24 autres cas, les sérums, antérieurs au cinquième jour de l'éruption, étaient inférieurs au 1/8e : il n'est pas possible ici d'en tirer une conclusion ; seul le titrage d'un sérum tardif l'aurait permis.

Enfin, chez 21 malades dont le sérum unique plus ou moins tardif comportait un titre variable d'anticorps, il nous fut impossible d'affirmer qu'il s'agissait d'une rubéole en cours.

L'étude des sérums isolés est donc sans valeur pour porter un diagnostic ; mais elle permet néanmoins d'établir la présence ou l'absence d'anticorps contre la rubéole. Nous utiliserons donc ces résultats dans l'étude systématique du niveau immunitaire de la population en fonction de l'âge.

C. — Epidémiologie : étude du niveau immunitaire d'une population contre la rubéole

1° Niveau immunitaire d'une population en fonction de l'age : cette étude porte sur 658 sérums concernant des sujets des deux sexes, mais avec une prédominance féminine, de zéro à soixante-quatorze ans.

On peut constater qu'à cinq ans un enfant sur deux a contracté la rubéole ; ultérieurement, le pourcentage de sujets immunisés s'élève, mais une grande partie de la population ne contracte cette infection que pendant l'adolescence.

A dix-neuf ans, 85,7 % des sujets sont immunisés.

Ce pourcentage passe à 90,7 % à vingt-quatre ans et à plus de 95 % au-delà de trente ans.

Les résultats sont groupés dans le *Tableau V* et la *figure 3*.

Si l'on compare, en utilisant nos documents statistiques, l'immunité acquise contre la rougeole et contre la rubéole chez les enfants, l'on remarque que l'infection morbilleuse est plus précoce dans les mêmes groupes d'âge. A cinq ans, environ 80 % des enfants ont contracté la rougeole et 55 % seulement la rubéole. Le pourcentage de sujets immunisés contre la rougeole est toujours plus important.

La *figure 4* résume ces données chez l'enfant jusqu'à dix ans.

2° Etude du titre des anticorps en fonction de l'age : en étudiant les titres obtenus dans deux groupes d'âges extrêmes (enfants de moins de cinq ans et adultes de plus de trente ans), en l'absence de notion clinique de rubéole récente, l'on voit que les enfants ont dans l'ensemble un titre d'anticorps plus élevé (*fig. 5*).

Ce titre élevé d'anticorps acquis très rapidement va se maintenir plusieurs mois, puis, au cours des années, va baisser lentement et se stabiliser à un niveau variable, témoin de l'immunité définitive.

Chez 3 sujets de plus de soixante-dix ans, nous avons constaté des titres d'anticorps inhibant l'hémagglutinine de la rubéole de 1/8e, 1/128e et 1/64e.

TABLEAU V : Taux d'immunité dans la population (658 sérums)
vis-à-vis de la rubéole, jusqu'au delà de 50 ans
vis-à-vis de la rougeole, jusqu'à l'âge de 10 ans

	GROUPE D'AGES	0-3 ans	3-5 ans	6-10 ans	11-15 ans	16-19 ans	20-24 ans	25-29 ans	30-50 ans	au delà de 50 ans
RUBEOLE	Nombre total de sérums	97	60	50	9	56	151	124	108	3
	Sérums positifs	19	33	28	8	48	137	115	103	3
	Pourcentage de sérums positifs	19,5 %	55 %	56 %	88 %	85,7 %	90,7 %	92,7 %	95,3 %	
ROUGEOLE	Nombre total de sérums	88	86	63	9					
	Sérums positifs	39	67	52	7					
	Pourcentage de sérums positifs	44,3 %	77,9 %	82,5 %						

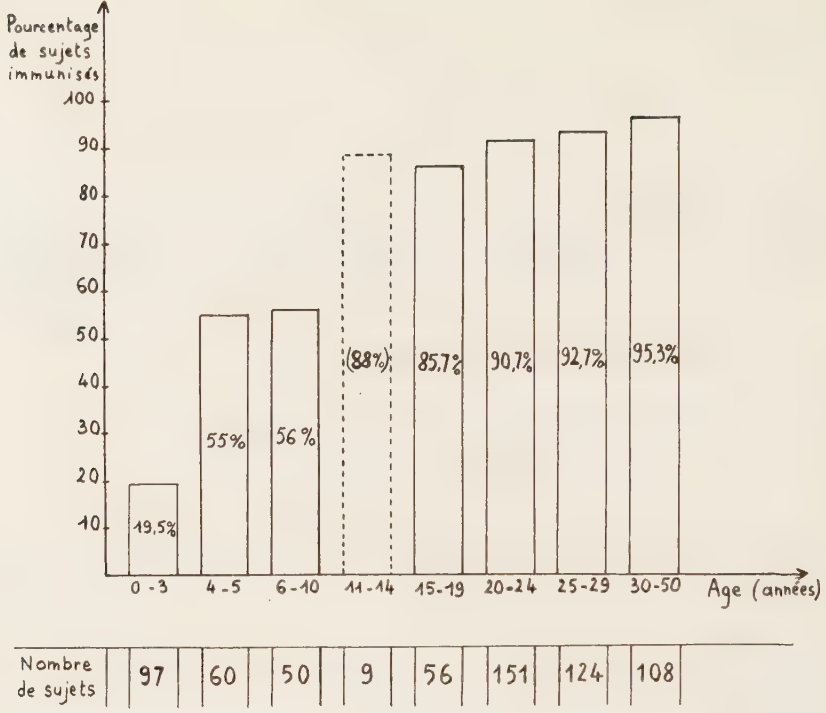

FIGURE 3

Niveau immunitaire de la population vis-à-vis de la rubéole, en fonction de l'âge

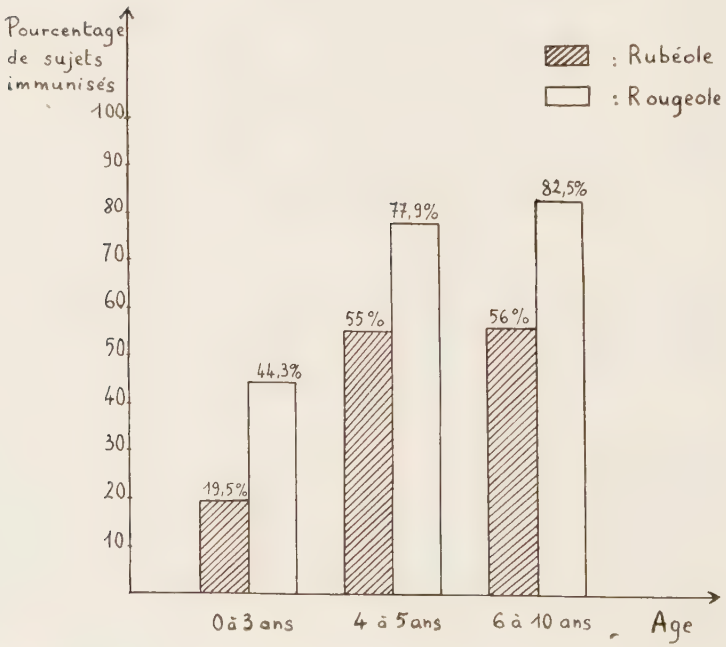

FIGURE 4

Comparaison du niveau immunitaire vis-à-vis de la rougeole et de la rubéole chez les enfants jusqu'à l'âge de 10 ans

FIGURE 5

Titre des anticorps inhibant l'hémagglutination de la rubéole, en fonction de l'âge

3° Etude du niveau immunitaire de la femme enceinte : nous avons étudié de façon systématique les sérums de 375 femmes enceintes de quinze à quarante-quatre ans. Un des avantages les plus importants du test d'inhibition de l'hémagglutination est en effet la possibilité de préciser à une femme, dans des délais très brefs, si elle est ou non protégée contre la rubéole.

La *figure 6* représente le pourcentage de femmes immunisées en fonction de l'âge (*Tableau VI*).

Dans l'ensemble, le pourcentage de femmes immunisées est de 92,2 % ; notons que jusqu'à vingt ans il n'est que de 85,7 %, alors qu'au-delà de trente ans il est de 95,3 %.

Il n'y a donc qu'une faible proportion de femmes adultes qui ne sont pas immunisées. Ceci est illustré dans la *figure 7*. Le *tableau VII* récapitule l'ensemble des femmes enceintes non immunisées.

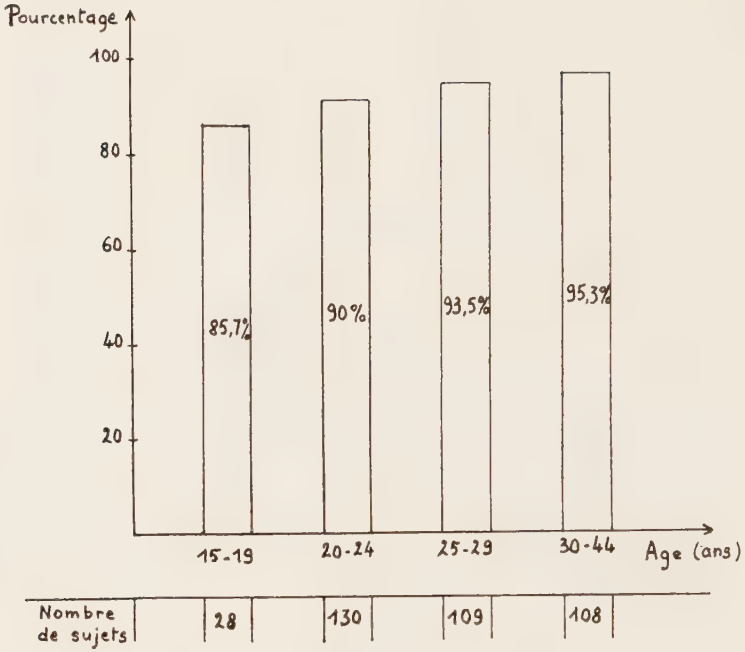

FIGURE 6

Pourcentage de femmes enceintes immunisées de 15 à 44 ans, en fonction de l'âge

TABLEAU VI : Immunisation contre la rubéole dans une population féminine : étude systématique de 375 femmes enceintes de 15 à 44 ans

Groupe d'âge	Nombre total de sérums	Nombre de sérums positifs	Pourcentage de sérums positifs
15 - 19 ans	28	24	85,7
20 - 24 ans	130	117	90
25 - 29 ans	109	102	93,5
plus de 30 ans	108	103	95,3
15 - 44 ans	375	346	92,2

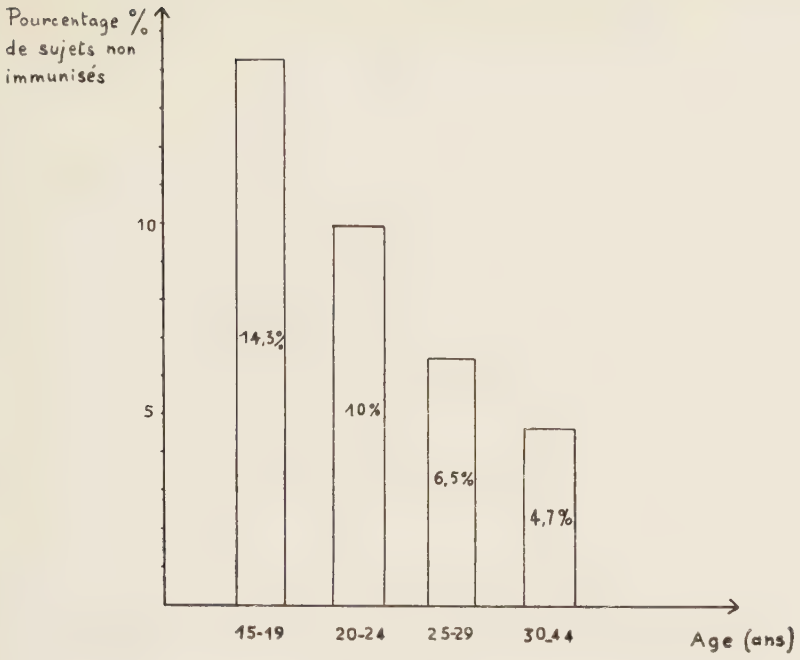

FIGURE 7

Pourcentage de femmes non immunisées
établi d'après l'étude de 375 femmes enceintes de 15 à 44 ans

TABLEAU VII : Femmes non immunisées contre la rubéole

1°) De 18 à 19 ans DOU.M. 18 ans LES. J. 18 ans SA. E. 19 ans BA. M.C. 19 ans	3°) De 25 à 29 ans GR. F. 25 ans AU. 25 ans LE. F. 25 ans BE. F. 25 ans BU. A. 28 ans DI. E. 29 ans BRI. S. 29 ans
2°) De 20 à 24 ans JAU. J. 20 ans LAU. Y. 20 ans CHA. S. 20 ans BOU. A. 21 ans LAS. S. 21 ans BON. M. 22 ans MO. A. 22 ans DE. S. 22 ans AB. D. 23 ans EM. F. 23 ans RI. J. 23 ans PE. L. 24 ans DU. M.F. 24 ans	4°) De 30 à 35 ans FER. M. 30 ans JE. E. 32 ans BAR. R. 32 ans PI. S. 34 ans VI. F. 35 ans

CHAPITRE VII

DISCUSSION

I. — COMPARAISON DES DIFFERENTS TESTS SEROLOGIQUES POUR LA DETECTION DES ANTICORPS RUBEOLEUX

Les réactions de neutralisation, d'immunofluorescence et de fixation du complément ont été utilisées avant la réaction d'inhibition de l'hémagglutination.

Nous en avons rappelé les techniques.

Quel est leur intérêt respectif et qu'apporte l'inhibition de l'hémagglutination ?

1° La réaction d'immunofluorescence, telle que l'ont décrite Brown, Maassab et Veronelli, puis Schaeffer, est délicate à réaliser et à interpréter. La fluorescence diminue à distance de l'infection ; elle est donc de peu d'intérêt pour un diagnostic rétrospectif.

Bien que spécifique et plus sensible que les réactions de fixation de complément (Lennette, Woodie, Schmidt et Gispen, Brand-Saathof), cette technique est peu utilisée.

2° La réaction de fixation du complément, simple dans sa réalisation pratique, nécessite, elle, un antigène de préparation difficile et coûteuse.

Plusieurs autres inconvénients limitent encore l'intérêt de cette réaction.

Les anticorps fixant le complément, dans la rubéole naturelle acquise, apparaissent plus tardivement que les anticorps neutralisants, fluorescents, ou inhibant l'hémagglutination, et de façon inconstante et irrégulière. Leur titre est bas et surtout transitoire : leur persistance est limitée à quelques mois ou années. Ainsi, Sever, Huebner, Fabiyi

et coll. trouvent un titre d'anticorps rarement supérieur à 1/32e et seulement pendant les quinze premiers mois qui succèdent à la maladie.

Dans la rubéole congénitale, à la naissance, le titre de l'enfant est semblable à celui de la mère, puis il baisse entre le premier et le cinquième mois de la vie, pour s'accroître ensuite à un niveau souvent plus élevé qu'antérieurement. Ce fait correspond à la baisse des anticorps maternels passivement transmis à l'enfant, puis à la synthèse par l'enfant de ses propres anticorps.

En raison de la labilité des anticorps fixant le complément, un diagnostic rétrospectif ne peut être fait et cette réaction ne peut être utilisée lors des enquêtes qui ont pour but d'apprécier le niveau immunitaire d'une population. Les auteurs précédents ont étudié 500 sérums provenant de femmes ayant présenté, dix à vingt ans plus tôt, une maladie éruptive identifiée cliniquement à une rubéole. Des anticorps neutralisants existaient chez 350 femmes, soit 70 % des cas, alors que les anticorps fixant le complément n'ont été trouvés que chez 164 femmes, soit seulement 32,8 % des cas.

On pourrait utiliser le fait que ces anticorps apparaissent tardivement dans le cours de la maladie, pour apprécier une séro-conversion, lorsqu'en cas d'éruption, de syndrome évoquant une rubéole ou d'un contage la faisant redouter, le premier sérum dit précoce a été prélevé trop tardivement. L'ascension du titre des anticorps inhibant l'hémagglutination, très précoce, a pu déjà se produire, et l'on ne peut alors porter le diagnostic de rubéole en cours par ce moyen. Mais l'inconstance de la réponse en anticorps fixant le complément ne permet pas toujours d'avoir la certitude.

Lors des essais de vaccination par une souche virale atténuée, il n'a pas été observé non plus de montée d'anticorps fixant le complément. Cette technique ne permet donc pas de déceler la séroconversion post-vaccinale.

Pour toutes ces raisons, cette réaction est pratiquement abandonnée.

3° La réaction de neutralisation a, contre elle, d'être longue ; elle ne permet donc pas un diagnostic d'urgence. Délicate, exigeant des cultures cellulaires parfaites, un virus bien adapté, elle impose une technique rigoureuse autant pour la neutralisation de l'effet cytopathogène en cas de neutralisation directe, que pour la réalisation de l'interférence en cas de neutralisation indirecte. Elle est donc difficilement reproductible d'un laboratoire à l'autre, et demeure inaccessible à un laboratoire non spécialisé dans les techniques virologiques.

Il s'agit d'une réaction complexe dans laquelle des variations peuvent être dues aux facteurs suivants : milieux utilisés, dose de virus rubéolique employée, variété de virus interférent, enfin production variable d'interféron par les cellules (Neva, Weller ; Parkman, Mundon, Mc Cown et coll. ; Schiff, Sever, Huebner).

C'est une réaction peu sensible, où le titre des anticorps reste toujours faible, généralement de 1/8e à 1/64e ; mais elle est fidèle et spécifique. Les anticorps neutralisants apparaissent souvent de façon précoce, dès le deuxième ou le troisième jour de l'éruption et ils dessinent une ascension nette, pour se stabiliser pendant quelques mois avant de décroître lentement. Un titre significatif semble persister toute la vie. Cette réaction, révélant des anticorps durables, permet donc un diagnostic rétrospectif.

Abandonnée actuellement au profit de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination de réalisation plus facile, elle avait rendu possibles d'intéressantes études cliniques et épidémiologiques.

Les courbes d'évolution dans le temps des anticorps neutralisants et des anticorps inhibant l'hémagglutination sont superposables, comme l'ont montré les études comparatives récentes de nombreux auteurs (Stewart ; Parkman ; Hopps et coll. ; Vandervelde, Field, Hutchinson et Thompson ; Boué, Nicolas et Lang ; Peetermans et Huygelen). Tous accordent une sensibilité beaucoup plus grande (jusqu'à vingt fois plus) à la réaction d'inhibition de l'hémagglutination. En étudiant 1.045 sérums de femmes enceintes, Field, Vandervelde et coll. trouvent des titres allant du 1/256e au 1/4.096e par la technique d'inhibition de l'hémagglutination et seulement du 1/8e au 1/64e par la technique de neutralisation.

II. — INTERET DE LA REACTION D'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION DANS LE DIAGNOSTIC DE LA RUBEOLE

1° Caractéristiques de cette réaction : l'intérêt de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination de la rubéole réside dans le fait qu'elle est *sensible, spécifique, fidèle* et *rapide*.

a) L'étude des 28 cas de rubéole certaine, que nous avons faite, prouve aussi cette grande *sensibilité* de la réaction. L'apparition des anticorps est précoce et leur ascension franche et importante. Ces résultats concordent avec ceux qu'ont obtenus les premiers auteurs (Stewart ; Parkman ; Hopps et coll.).

b) La *spécificité* de cette réaction est certaine. Stewart et coll. n'observent aucune réaction croisée avec la rougeole, les oreillons et la varicelle.

c) La *fidélité* de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination est prouvée (Field et coll.).

Elle est parfaitement reproductible.

Les résultats sont identiques par la microtechnique et par la macrotechnique.

Mais il est indispensable de respecter une technique rigoureuse, en particulier dans le temps d'adsorption des inhibiteurs non spécifiques par le kaolin, qui doit être suffisant mais non trop poussé, afin d'éviter les résultats faussement négatifs. Sever, Fuccillo et coll. insistent sur ce point. Comme ces derniers auteurs, nous avons pratiqué l'adsorption par le kaolin après le temps d'adsorption par les globules rouges. Il semble que, dans cet ordre, on fait disparaître de façon encore plus complète les inhibiteurs non spécifiques.

D'autre part, le pH des diluants doit être ajusté soigneusement et vérifié avant la réaction. L'utilisation d'un diluant à pH acide donne, semble-t-il, une plus grande sensibilité, mais aux dépens de la fidélité, et l'on risque alors d'obtenir des résultats faussement positifs.

2° Importance des deux prélèvements de sérum faits en temps voulu : il ressort que cette technique rapide, spécifique, sensible, fidèle, donc reproductible, est d'un très grand intérêt pour le diagnostic des éruptions de l'enfant ou de l'adulte ; mais il est fondamental d'obtenir en temps voulu les deux prélèvements successifs de sérum.

En effet, dans les cas où l'examen sérologique est fait de façon systématique, lors des consultations prénuptiales ou prénatales, sans qu'existe la moindre notion de contact ni d'éruption, l'examen d'un seul sérum permet de dire si la femme est ou n'est pas immunisée. Mais, en dehors de ces cas, il est indispensable de disposer de deux prélèvements de sérum :

— *Le premier sérum « précoce »* doit être prélevé le plus tôt possible :
  — le jour du contact, si l'on a cette notion ;
  — ou le premier jour de l'éruption.
— *Le deuxième sérum « tardif »* sera prélevé dix à quinze jours après l'éruption.

L'idéal est d'obtenir le premier sérum plusieurs jours avant l'éruption. Dans ce cas, la présence d'anticorps permet d'affirmer qu'il y a

eu rubéole ancienne et de rassurer immédiatement le sujet sur le risque d'une rubéole actuelle.

Dans notre étude, pour 30 cas, le séro-diagnostic nous fut demandé en urgence pour des femmes enceintes qui avaient été en contact avec des rubéoleux. Dans chacun de ces cas, le prélèvement sanguin fait précocement a pu affirmer la présence d'anticorps témoins d'une infection ancienne. Il nous fut donc possible de rassurer très rapidement la femme, et de lui éviter des injections de gamma-globulines parfaitement inutiles.

Lorsque le sérum précoce n'est obtenu que le deuxième ou le troisième jour de l'éruption, l'existence d'un titre faible d'anticorps ne permet pas de conclure. Seule l'ascension du titre des anticorps sur deux sérums successifs permettra le diagnostic.

On sait que les anticorps apparaissent très précocement et que leur titre dès le quatrième ou cinquième jour de l'éruption peut être déjà très élevé. Lorsque le premier sérum n'est obtenu qu'à ce stade, l'importante notion que représente l'ascension des anticorps ne pourra être appréciée.

Il est certain qu'en milieu hospitalier le stockage systématique du sérum de tout malade, prélevé à son entrée et à sa sortie, permettrait dans bien des cas de résoudre ce problème. Ce stockage rendrait aussi possibles bien des enquêtes épidémiologiques, par exemple lorsqu'un nouvel agent infectieux est isolé, comme ce fut le cas en 1962 pour le virus de la rubéole.

Que faire lorsque le diagnostic de rubéole demande à être précisé de façon certaine et lorsque manque le sérum précoce ?

Certes, on peut encore tenter l'isolement du virus dans le prélèvement de gorge, mais le résultat en est incertain et demande plusieurs jours.

L'étude des anticorps fixant le complément, plus tardifs, pourrait mettre en évidence l'ascension caractéristique de leur titre. Mais ces anticorps peuvent aussi manquer totalement. Du fait de leur labilité et de leur inconstance, ils n'apportent souvent aucune certitude.

Récemment, Banatvala et coll., de même que Vesikari et Vaheri, ont mis au point une technique d'analyse des immunoglobulines, qui permettrait de différencier les anticorps nouvellement synthétisés à l'occasion d'une infection récente et ceux qui sont le reflet d'une maladie ancienne. Ainsi, les anticorps synthétisés en premier sont des gamma M-immunoglobulines. Ultérieurement, ce sont des gamma A-immunoglobulines et des gamma G-immunologlobulines. La mise en évidence de gamma M-immunoglobulines parmi les anticorps inhibant l'hémagglutination permet ainsi d'affirmer que l'infection est récente.

Cette méthode demande à être vérifiée ; elle n'est pas encore de pratique courante. Il n'est donc pas possible, actuellement, de préciser le diagnostic lorsqu'on ne possède qu'un seul sérum ; dans 59 de nos cas, par absence de sérum tardif, ou parce que le sérum dit précoce était en fait trop tardif, nous avons été dans l'impossibilité de conclure.

Les causes des éruptions rubéoliformes sont en fait bien diverses. Certaines d'entre elles peuvent être de nature toxique, allergique, virale surtout (Entérovirus : Coxsackie et virus ECHO ; Adénovirus ; Myxovirus). Dans l'étude que nous avons faite d'un groupe de 55 cas d'éruptions douteuses, 14 fois furent isolés des virus. Mais quelle est la responsabilité de ces virus dans l'éruption ? On peut se le demander.

Dans un cas singulier, l'ascension des anticorps fut trouvée à la fois contre le virus de la rubéole et contre un virus ECHO qui fut isolé. On peut penser ici que l'éruption était due à une rubéole authentique, accompagnée ou suivie d'une infection à virus ECHO.

Dans les 13 autres cas, c'est 8 fois seulement qu'il fut trouvé des anticorps à titre élevé ou subissant une ascension significative contre le virus isolé ; le taux des anticorps inhibant l'hémagglutination de la rubéole est resté stationnaire. On peut donc exclure l'hypothèse de rubéole et penser avec quelque raison que la présence d'anticorps ou leur ascension et l'éruption ne sont pas qu'une simple coïncidence. Ces éruptions, il faut le noter, sont toutes survenues à l'automne, et l'on sait que les rubéoles apparaissent généralement après l'automne et persistent jusqu'à l'été.

3° Dans la rubéole congénitale, l'étude sérologique des nourrissons permet de suivre le taux des anticorps et de déterminer s'il s'agit d'anticorps transmis par la mère et dont le titre tombe en quatre à cinq mois.

Certaines découvertes paradoxales sont difficilement explicables.

Chez l'enfant et l'adulte, le virus disparaît du sang dès l'éruption et l'apparition des anticorps ; il persiste encore quelques jours dans le nasopharynx.

Chez l'enfant atteint de rubéole congénitale, le virus peut persister plus longtemps, dans les différents organes et dans la gorge, comme l'ont prouvé de très nombreux auteurs (Menser et coll. ; Schiff, Sever et coll. ; Plotkin et coll.).

Comment expliquer cette persistance du virus malgré la présence d'anticorps à un titre valable ?

Dans les premières semaines de la vie, on trouve des gamma A et des gamma G-immunoglobulines transmises par la mère, mais aussi une petite quantité de gamma M-immunoglobulines qui ne peuvent provenir que de l'enfant lui-même.

Puis les anticorps transmis par la mère disparaissent vers le cinquième mois ; le nourrisson synthétise alors ses propres immunoglobulines ; c'est seulement à partir de cette période active immunologiquement que l'on isole plus difficilement le virus dans les prélèvements de gorge du jeune malade.

II. — INTERET DE LA REACTION D'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION EN EPIDEMIOLOGIE

1° La réaction d'inhibition de l'hémagglutination appliquée a la rubéole, simple, pourrait être utilisée facilement sur une grande échelle, par exemple lors d'épidémies. Elle permettrait de rattacher à la rubéole des symptômes atypiques ou de dépister des formes inapparentes.

Lors de l'épidémie des îles Saint-Paul en Alaska, Brody, en 1963, a dépisté un pourcentage de 50 % de formes latentes. Ce même pourcentage est retrouvé par Krugman, Horstmann ; mais il varie selon les régions, et Parkman, Buescher, notent jusqu'à six formes inapparentes pour une forme apparente chez les recrues militaires.

Ces formes latentes sont aussi lourdes de conséquences chez la femme enceinte dans les premiers mois de gestation que les formes régulières. En étudiant l'anamnèse de 22 femmes ayant mis au monde des enfants atteints de rubéole congénitale, Korones, Ainger et Monif retrouvent six fois la notion d'une contamination rubéolique pendant le premier trimestre de la grossesse, sans aucune maladie apparente consécutive ; dans 4 autres cas, ni exposition ni maladie ; enfin dans 2 cas, aucune précision n'a pu être fournie. Dans les 22 cas de rubéole congénitale observés, 10 au moins n'avaient été précédés d'aucun symptôme évoquant la rubéole chez la mère.

Inapparente chez la mère, mais se manifestant chez l'enfant dans bien des cas, la rubéole peut aussi être latente chez l'enfant. Ainsi, Schiff, Sutherland, Light et Bloom à Cincinnati, dans une étude systématique, ont recherché le virus de la rubéole et effectué les réactions sérologiques correspondantes (neutralisation) chez tous les enfants nés l'année suivant l'épidémie, qu'ils soient normaux ou non. De façon assez surprenante, ils ont découvert que 14 % des nouveaunés apparemment normaux à la naissance étaient porteurs de virus, donc source possible de contagion pour le personnel soignant et les autres enfants, et qu'ils possédaient des anticorps persistants. On pou-

vait donc conclure à l'existence d'une rubéole congénitale, sans manifestation clinique. L'avenir de ces enfants n'est d'ailleurs pas dénué de risque, car l'on a vu tardivement se constituer chez eux diverses anomalies du développement physique ou mental.

2° Dans l'étude que nous avons faite du NIVEAU IMMUNITAIRE DE LA POPULATION, il se confirme que la *rubéole* est une maladie acquise dans la deuxième enfance et l'adolescence, donc plus tardivement que la *rougeole*. A vingt ans, environ 90 % des sujets sont immunisés ; peu de femmes donc restent réceptives.

Les chiffres que nous avons rassemblés concordent avec les *enquêtes épidémiologiques* faites jusqu'à présent en France. Elles sont peu nombreuses, en raison de la difficulté de rassembler assez de documents par la technique de neutralisation, la seule utilisable ces dernières années.

En 1966, SOHIER et Mme HENRY, dosant les anticorps neutralisants chez 201 sujets de sexe féminin, âgés de six à trente-cinq ans, obtiennent les résultats suivants :
— 51 % de sujets immunisés de six à huit ans ;
— 61 % de dix à douze ans ;
— 80 % de dix-sept à vingt-deux ans ;
— 86 % de vingt-trois à vingt-neuf ans ;
— et 75 % de trente à trente-cinq ans.

On peut expliquer le pourcentage plus bas (75 %) observé de trente à trente-cinq ans par le fait que le titre d'anticorps baisse progressivement au cours des années suivant l'infection. La neutralisation est une technique peu sensible et un certain pourcentage de femmes immunisées possédant un titre bas d'anticorps neutralisants doit échapper à la détection par cette méthode.

Par la technique d'inhibition de l'hémagglutination, BOUÉ fait état d'un taux d'immunité de 93 % dans un groupe de jeunes filles de dix-huit à vingt-quatre ans.

Chez 850 donneurs de sang lyonnais d'un âge moyen de quarante ans, NICOLAS trouve un pourcentage de 98 % de sujets immunisés ; chez 64 élèves infirmières, un pourcentage de 95 % ; enfin chez 75 femmes enceintes de dix-huit à quarante-deux ans, un pourcentage de 92 %.

Nous avons détecté, dans notre étude de 375 femmes enceintes de la région parisienne, âgées de quinze à quarante-quatre ans, un pourcentage de 92,2 % de sujets immunisés.

Cet état immunitaire varie pourtant selon les régions et les pays. En France, la maladie semble assez répandue et rien ne permet de

craindre une flambée épidémique prochaine. D'autres pays européens ont à peu près le même niveau immunitaire.

En Angleterre, une étude faite à Manchester montre que 90 % des femmes sont immunisées.

En Suède, SVEDMYR et THOREN trouvent une proportion de femmes immunisées de 87 %.

Aux Etats-Unis, SCHIFF et SEVER, sur une étude de 600 sérums, trouvent que 17,5 % des femmes ne possèdent pas d'anticorps.

La situation immunitaire est toute différente aux îles Hawaï. SEVER et coll. trouvent qu'à Honolulu 58 % des femmes, et à Hilo 71 % des femmes ne sont pas immunisées. Mais ces chiffres ont été obtenus par la recherche des anticorps neutralisants. Des chiffres plus élevés seraient sans doute trouvés par l'inhibition de l'hémagglutination qui est une méthode plus sensible.

3° Ces anticorps inhibant l'hémagglutination ou neutralisants sont PROTECTEURS. Il semble qu'un titre de 1/8e d'anticorps inhibant l'hémagglutination protège efficacement. Les tentatives d'infection expérimentale chez des sujets ayant des anticorps neutralisants (GREEN et coll.) se sont toutes soldées par un échec ; de même chez les sujets déjà possesseurs d'anticorps neutralisants ou inhibant l'hémagglutination, le titre obtenu ne subit aucune majoration après administration du vaccin.

4° C'est pourquoi depuis de nombreuses années la prophylaxie de la rubéole chez les femmes enceintes a été tentée par des injections de gamma-globulines. Les anticorps inhibant l'hémagglutination ont été titrés dans différents lots de gamma-globulines standard : tous en contiennent à des titres variables généralement élevés, de 1/256e à 1/2.048e (MURPHY et REID ; SCHIFF, SEVER, HUEBNER ; KORNS, GRAYSTON et WATTEN).

La *prophylaxie par les gamma-globulines* a été diversement appréciée. Certains auteurs leur accordent une réelle valeur, d'autres considèrent qu'elles ne font que masquer l'infection. On ne peut répondre formellement à cette question si controversée de l'efficacité des gamma-globulines. Les techniques sérologiques simples et rapides sont trop récentes, et nous n'avons pas encore suffisamment de documents rassemblés. Les données statistiques anciennes sont difficilement interprétables.

En effet, jusqu'à l'isolement du virus en 1962, aucune réaction sérologique ne pouvait renseigner sur l'état d'immunité préexistant au contage chez une femme enceinte.

D'autre part, le diagnostic de rubéole ne pouvait être affirmé avec certitude ni chez la femme, ni chez le sujet éventuellement contaminateur. Le diagnostic clinique de rubéole est très souvent erroné ; la plasmocytose sanguine est un argument insuffisant. En 1965, dans une étude très précise, SEVER, NELSON et GILKENSON ne confirment par la sérologie que 74 % des cas de rubéole diagnostiqué cliniquement.

D'après certaines statistiques anciennes, il semble que l'administration de gamma-globulines ait un réel effet préventif.

BADILLET et HERZOG n'observent que 10 malformations considérées comme étant d'origine rubéolique, après administration de gamma-globulines à 2.390 femmes enceintes ayant été en contact avec un sujet suspect de rubéole.

LUNDSTRÖM, en 1961, n'observe que 2,4 % d'embryofœtopathies rubéoliques dans un groupe de 251 femmes exposées à la rubéole.

MC DONALD et PECKHAM, dans un groupe de 610 femmes enceintes, font les constatations suivantes : 1,95 % des femmes ayant des contacts répétés, quotidiens, familiaux, par exemple, avec un de leurs enfants atteint de rubéole, contractent la maladie malgré la prophylaxie, et 0,48 % seulement des femmes sont atteintes lorsque le contage a été occasionnel et de courte durée.

Il faut remarquer que 70 % seulement des femmes ont mené à terme leur grossesse. Parmi les femmes qui ont présenté une rubéole malgré la prophylaxie, 40 % ont des enfants malformés, ce qui est le pourcentage habituel.

Des études plus récentes ont été menés lors des épidémies de 1963-1964, aux Etats-Unis.

SEVER et coll., BRODY et coll. pensent que de fortes doses de gamma-globulines (1.500 mg pour BRODY) diminuent les manifestations cliniques et aussi le risque malformatif. Le nombre des rubéoles apparentes est certainement très diminué. Lorsque la rubéole survient, sa période d'incubation est en général plus longue. Les résultats obtenus avec les gamma-globulines sont différents en cas de rubéole naturelle et en cas de rubéole expérimentale. L'injection de gamma-globulines n'a jamais empêché l'apparition d'une rubéole expérimentale dans les études de GREEN, BALSAMO et coll., chez de jeunes enfants. Il semble seulement que la période de virémie soit raccourcie.

Les progrès sérologiques récents vont permettre dans l'avenir de se faire une idée plus précise sur l'efficacité des gamma-globulines en précisant l'état immunitaire des femmes au moment du contact.

Une enquête anglaise du Public Health Laboratory Service, publiée en septembre 1967, et menée sous la direction de HUTCHINSON, rapporte les résultats obtenus par l'injection de 1 dose (750-800 mg),

moins de trois jours après le contact, suivie ou non de l'injection d'une deuxième dose de gamma-globulines (1.500 mg en tout) quelques jours plus tard.

Sur 30 femmes réceptives ayant reçu une seule dose, 26,7 % contractèrent la rubéole.

Sur 29 femmes réceptives ayant reçu les 2 doses, 31 % furent atteintes.

Les résultats sont donc comparables dans les deux groupes.

Environ un tiers des femmes réceptives contractèrent une rubéole cliniquement apparente ou seulement détectée par la sérologie. Il n'est pas mentionné l'incidence de la rubéole sur la grossesse et l'état du nouveau-né.

On ne peut donc avoir aucune certitude de protection totale, même lorsque les gamma-globulines sont administrées précocement et à forte dose.

Ainsi Mc Lean et Mc Naughton, à Toronto, observent un enfant très sévèrement atteint de rubéole congénitale. Sa mère avait reçu des gamma-globulines immédiatement après le contage et n'avait présenté aucun signe clinique de rubéole.

De même Plotkin, Cochran et Lindquist, sur 12 cas de rubéole congénitale, ne trouvent la notion d'injection de gamma-globulines que chez 2 femmes ; l'une avait présenté une rubéole typique, l'autre n'avait présenté aucun signe clinique de maladie.

Les variations dans le mode de contamination, dans la dose, la voie d'administration et le titre d'anticorps contenus dans les gamma-globulines peuvent expliquer ces résultats différents.

Actuellement, la réaction d'inhibition de l'hémagglutination permet en moins de vingt-quatre heures d'affirmer qu'une femme est ou non immunisée. On peut faire le diagnostic aussi rapidement chez le sujet éventuellement contaminateur. En France, plus de 90 % des femmes sont immunisées. Le risque de rubéole peut être écarté dans la très grande majorité des cas et l'injection de gamma-globulines, parfaitement inutiles dans ces cas, évitée, à condition de pratiquer cet examen en dépistage systématique.

Mais 10 % des femmes jeunes restent réceptives au virus de la rubéole. La réaction d'inhibition de l'hémagglutination permettra de les dépister.

Il serait souhaitable, dans l'avenir, de réaliser une sérologie systématique de la rubéole, lors de l'examen prénuptial par exemple.

Ce dépistage serait aussi particulièrement intéressant chez des femmes que leur activité professionnelle expose singulièrement à ce

risque : personnel scolaire, hospitalier, des crèches, des jardins d'enfants.

Il serait alors possible de proposer à ces femmes non immunisées la vaccination, lorsque le vaccin atténué, dont les premiers essais sont satisfaisants, aura suffisamment fait ses preuves et sera mis à la portée matérielle de tous.

Ultérieurement, la vaccination s'adresserait à des adolescents et à des enfants plus jeunes afin d'affecter le réservoir de virus dans la population.

CONCLUSIONS

L'avènement de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination a marqué un progrès considérable dans la sérologie de la rubéole.

Telle que nous l'avons pratiquée, elle est facile à réaliser, car nous utilisons :

— une hémagglutinine virale lyophilisée ;
— un seul diluant, le tampon Dextrose-Gélatine-Véronal, pour tous les temps de la réaction ;
— des globules rouges de pigeon adulte, plus faciles à obtenir que les globules rouges de poussin de moins de vingt-quatre heures utilisés dans d'autres techniques.

L'étude de 800 sérums recueillis depuis le mois de septembre 1967, tend à prouver qu'il s'agit d'une réaction réellement fidèle et reproductible, à condition que soient bien respectés les temps d'adsorption des inhibiteurs non spécifiques contenus dans les sérums. D'autre part, elle est rapide, permettant dans les cas urgents de donner une réponse en moins de vingt-quatre heures ; de spécificité certaine, elle est d'une très grande sensibilité, sans aucun doute la plus sensible de toutes les méthodes sérologiques utilisées jusqu'ici pour la rubéole : neutralisation, immunofluorescence et fixation du complément.

Elle reconnaît donc *plusieurs applications de grand intérêt :*

I. — Diagnostic

1° Pour le diagnostic des exanthèmes :

Dans la rubéole, l'apparition des anticorps inhibant l'hémagglutination est précoce et, dans deux échantillons de sérum, l'un prélevé le plus rapidement possible après l'éruption, l'autre une dizaine de jours plus tard, la montée du titre d'anticorps est brutale et très nette, pouvant atteindre ou dépasser le titre de 1/4.096e.

La spécificité de cette réaction étant certaine, nous avons pu ainsi affirmer le diagnostic de rubéole dans 28 cas et, en revanche, l'éliminer formellement 72 fois.

Dans ce second groupe, il s'agissait :

— de rougeole, dans 17 cas, pour lesquels les titres d'anticorps inhibant l'hémagglutinine de la rubéole sont restés stables à deux examens sériques successifs : inférieurs à 1/8e et le demeurant, ces anticorps témoignent d'une réceptivité au virus de la rubéole ; supérieurs à 1/8e, ils témoignent d'une immunité due à une infection rubéolique antérieure ;

— d'une autre infection virale, vraisemblablement dans 7 cas où des entérovirus ont été isolés, principalement des virus ECHO, avec titre élevé ou ascension d'anticorps ;

— ailleurs, l'origine de l'éruption n'a pu être éclaircie.

C'est dire tout l'intérêt de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination pour confirmer le diagnostic clinique souvent difficile des exanthèmes rubéoliformes dont l'étiologie est en fait très diverse.

2° Pour le diagnostic de la rubéole congénitale :

Nous n'avons pas eu l'occasion d'étudier de sérum provenant d'enfants atteints de rubéole congénitale.

Les études faites antérieurement montrent tout l'intérêt de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination pour suivre le titre d'anticorps de ces enfants au cours de l'évolution de la maladie.

La méthode pourra aussi dépister d'éventuels enfants atteints de rubéole congénitale apparemment sains à la naissance, mais porteurs de virus, donc source de contagion pour leur entourage, et chez lesquels peuvent se manifester tardivement des troubles du développement physique ou mental.

3° Pour le diagnostic des formes trompeuses sans éruption et des formes inapparentes, de la rubéole, qui sont extrêmement fréquentes en période d'épidémie, et à la suite d'injections de gammaglobulines.

L'intérêt de ces formes est grand, car elles semblent capables tout autant que la maladie régulière, d'engendrer la redoutable embryofœtopathie rubéolique.

II. — Appréciation du niveau immunitaire de la population, en particulier féminine

Les anticorps inhibant l'hémagglutination, les statistiques l'ont montré avec évidence, persistent en effet indéfiniment, témoins de l'immunité acquise vis-à-vis de la rubéole ; leur évaluation permet un diagnostic rétrospectif.

1° Tout d'abord, chez la femme enceinte, le séro-diagnostic peut être demandé dans trois circonstances bien différentes :

— *lors d'une éruption,* et à condition d'avoir deux échantillons de sérum, l'un précoce et l'autre tardif, le diagnostic de rubéole peut être affirmé ou éliminé de façon sûre ;

— *lors d'un contact,* le sérum prélevé le jour même permet de dire si la femme est en état d'immunité ou de réceptivité vis-à-vis de la rubéole. Le test sera fait parallèlement, si cela est possible, sur les deux sérums du sujet suspect, éventuellement contaminateur ;

— *à titre systématique,* enfin, pour apprécier l'état d'immunité. Le niveau immunitaire semble élevé en France. Dans notre étude, sur 375 femmes habitant la région parisienne, 346 (soit 92,2 %) possédaient des anticorps.

2° La pratique de cette réaction d'inhibition de l'hémagglutination pourrait donc être étendue au dépistage systématique des femmes réceptives au virus de la rubéole.

Cette minorité de sujets pourrait bénéficier d'une vaccination dans les années à venir, comme le laisse espérer la mise au point de souches virales atténuées dont l'efficacité semble démontrée par les premiers travaux.

La vaccination est suivie d'une ascension du titre d'anticorps inhibant l'hémagglutination. Il faudra pourtant en apprécier la stabilité dont dépendra la protection réelle et durable des sujets.

Vu, le Doyen :
G. BROUET

Vu, le Président de Thèse :
D. CHRISTOL

Vu et Permis d'imprimer,
le Recteur d'Académie,
Adjoint au Recteur de l'Académie de Paris :
C. CHALIN

BIBLIOGRAPHIE

ACHS (R.), HARPER (R.G.) et SIEGEL (M.). — Unusual dermatoglyphic finding associated with rubella embryopathy. (*New. Eng. J. Med.*, 1966, **274**, 148-150.)

ACKROYD (J.F.). — Three cases of thrombocytopenic purpura occuring after rubella. (*Quart. J. Med.*, 1949, **18**, 299-318.)

AINGER (L.E.), LAWYER (N.G.) et FITCH (C.W.). — Neonatal rubella myocarditis. (*Brit. Heart J.*, 1966, **28**, 691-697.)

ALFORD (C.A. Jr), NEVA (F.A.) et WELLER (T.H.). — Virologic and serologic studies on human products of conception after maternal rubella. (*New Eng. J. Med.*, 1964, **271**, 1275-1281.)

ALFORD (C.A. Jr). — Studies on antibody in congenital rubella infections. I : physicochemical and immunologic investigations of rubella neutralizing antibody. (*Am. J. Dis. Child.*, 1965, **110**, 455-463.)

ALFORD (C.A. Jr) et KANICH (L.S.). — Congenital rubella : a review of the virologic and serologic phenomena occuring after maternal rubella in the first trimester. (*South. Med. J.*, 1966, **59**, 745-748.)

ALFORD (C.A. Jr). — A correlative immunologic, microbiologic and clinical approach to the diagnosis of acute and chronic infections in newborns infants. (*New Eng. J. Med.*, 1967, **277**, 437-449.)

ALISON (F.). — Enquête sur les embryopathies et leurs rapports avec la pathologie de la gestation. (*Bull. Inst. Nat. Hyg.*, 1966, **11**, 391-399.)

ALTER (M.) et SCHULENBERG (R.). — Dermatoglyphics in the rubella syndrome. (*J.A.M.A.*, 1966, **197**, 685-688.)

ANDERSON (S.G.). — Experimental rubella in human volunteers. (*J. Immunol.*, 1949, **62**, 29-40.)

AVERY (G.B.), MONIF (G.R.G.), SEVER (J.L.) et LEIKIN (S.L.). — Rubella syndrome after inapparent maternal illness. (*Am. J. Dis. Child.*, 1965, **110**, 444-446.)

Babbott (F.L.), Rodenberger (B.M.) et Ingalls (T.H.). — Rubella. Morbidity in a schoolboy population, 1935-1959, and a comparison with Measles, Mumps and Chickenpox. (*J.A.M.A.*, 1961, **178**, 542-546.)

Badillet (M.) et Herzog (F.). — Essai de prévention des embryopathies rubéoliques par les gamma-globulines plasmatiques humaines standard chez les femmes enceintes particulièrement exposées (2.428 dossiers). (*Arch. Ges. Virusforsch.*, 1965, **16**, 509-512.)

— Gamma-globulines et rubéole. (*Presse Méd.*, 1967, **75**, 799-802.)

Banatvala (J.E.), Horstmann (D.M.), Payne (M.C.) et Gluck (L.). — Rubella syndrome and thrombocytopenic purpura in newborn infants : clinical and virologic observations. (*New Eng. J. Med.*, 1965, **273**, 474-478.)

Banatvala (J.E.), Best (J.M.), Kennedy (E.A.), Smith (E.E.) et Spence (M.E.). — A serological method for demonstrating recent infection by rubella virus. (*Brit. Med. J.*, 1967, **3**, 285-286.)

Banatvala (J.E.). — Laboratory investigations in the assessment of rubella during pregnancy. (*Brit. Med. J.*, 1968, **1**, 561-562.)

Bayer (W.L.), Sherman (F.E.), Michaels (R.H.), Szeto (I.L.F.) et Lewis (J.H.). — Purpura in congenital and acquired rubella. (*New Eng. J. Med.*, 1965, **273**, 1362-1366.)

Beale (A.J.), Christofinis (G.C.) et Furminger (I.G.). — Rabbit cells susceptible to rubella virus. (*Lancet*, 1963, **2**, 640-641.)

Beale (A.J.) et Christofinis (G.). — Growth of RK 13 cells. (*Symposium International sur la Standardisation des Vaccins contre la Rougeole et la Sérologie de la Rubéole*, Lyon, 18-19-20 juin 1964. 1 vol., Lyon, Institut Mérieux éd., 1964, pp. 103-104.)

Bellanti (J.A.), Artenstein (M.S.), Olson (L.C.), Buescher (E.L.), Luhrs (C.E.) et Milstead (K.L.). — Congenital rubella. Clinicopathologic, virologic and immunologic studies. (*Amer. J. Dis. Child.*, 1965, **110**, 464-472.)

Bernard (J.) et Grenet (P.). — Le diagnostic hématologique de la rubéole. (*Arch. Fr. Péd.*, 1951, **8**, 128-135.)

Best (J.M.), Banatvala (J.E.), Almeida (J.D.) et Waterson (A.P.). — Morphological characteristics of rubella virus. (*Lancet*, 1967, **2**, 237-239.)

Boué (A.), Plotkin (S.A.) et Boué (J.G.). — Action du virus de la rubéole sur différents systèmes de cultures de cellules embryonnaires humaines. (*Arch. Ges. Virusforsch.*, 1965, **16**, 443-458.)

Boué (A.). — Action du virus de la rubéole sur les cellules embryonnaires humaines *in vitro*. (*Rev. Fr. Et. Clin. Biol.*, 1966, **11**, 569-577.)

— Les viroses prénatales. La rubéole congénitale. (*Rev. Praticien*, 1966, **16**, 2311-2316.)

— La rubéole congénitale. I : Biologie, pathogénie, prophylaxie. (*Arch. Fr. Péd.*, 1967, **24**, 333-350.)

— Vaccination contre la rubéole. (*Presse Médic.*, 1967, **75**, 950.)

— Sérodiagnostic de la rubéole. (*Bull. Acad. Nat. Méd.*, 1967, **151**, 266-270.)

Boué (J.G.), Boué (A.) et Lazar (Ph.). — Altérations chromosomiques induites par le virus de la rubéole et par le virus de la rougeole dans les cultures diploïdes humaines cultivées *in vitro*. (*Path. Biol.*, 1967, **15**, 997-1007.)

Boué (A.) et Deshayes (E.). — Technique indirecte de séroneutralisation du virus de la rubéole sur cellules diploïdes humaines. (*Path. Biol.*, 1967, **15**, 324-328.)

Boué (A.) et Celers (J.). — Vaccination contre la rubéole. Essais cliniques avec la souche de virus atténué HPV 77. (*Presse Méd.*, 1968, **76**, 299-302.)

Boué (A.), Nicolas (A.) et Lang (R.). — La technique d'inhibition de l'hémagglutination du virus rubéole. Applications pratiques. (*Ann. Inst. Pasteur*, 1968, **114**, 317-330.)

Brody (J.A.), Sever (J.L.), Mc Alister (R.), Schiff (G.M.) et Cutting (R.). — Rubella epidemic on St Paul Island in the Pribilofs 1963. I. Epidemiologic, clinical and serologic findings. (*J.A.M.A.*, 1965, **191**, 619-623.)

Brody (J.A.), Sever (J.L.) et Schiff (G.M.). — Prevention of rubella by gammaglobulin during an epidemic in Barrow, Alaska in 1964. (*New Engl. J. Med.*, 1965, **272**, 127-129.)

Browm (G.C.), Maassab (H.F.), Veronelli (J.A.) et Francis (Th. Jr). — Detection of rubella antibodies in human serum by the indirect fluorescent antibody technique. (*Arch. Ges. Virusforsch.*, 1965, **16**, 459-462.)

Buescher (E.L.). — Behavior of rubella virus in adult populations. (*Arch. Ges. Virusforsch.*, 1965, **16**, 470-476.)

Burnett (J.W.) et Alford (C.A.). — Comparative effectiveness of two culture techniques for isolation of rubella virus. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1965, **120**, 569-572.)

Butler (N.R.), Dudgeon (J.A.), Hayes (K.), Peckham (C.S.) et Wybar (K.). — Persistance of rubella antibody with and without embryopathy. A follow-up study of children exposed to maternal rubella. (*Brit. Med. J.*, 1965, **2**, 1027-1029.)

Cabasso (V.J.) et Stebbins (M.R.). — Study of the spread of rubella virus from inoculated to uninoculated contact *Cercopithecus* monkeys. (*J. Lab. Clin. Med.*, 1965, **65**, 612-616.)

Carver (D.H.), Seto (D.S.Y.), Marcus (P.I.) et Rodrigues (L.). — Rubella virus replication in the brains of suckling mice. (*J. Virol.*, 1967, **1**, 1089-1090.)

Cifarelli (P.S.) et Freireich (A.W.). — Rubella encephalitis. (*N.Y. State J. Med.*, 1966, **66**, 1117-1122.)

Chang (T.H.), Moorhead (P.S.), Boué (J.G.), Plotkin (S.A.) et Hoskins (J.M.). — Chromosome studies of human cells infected *in utero* and *in vitro* with rubella virus. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1966, **122**, 236-243.)

Clarke (D.H.) et Casals (J.). — Techniques for hemagglutination and hemagglutination - inhibition with arthropod - borne viruses. (*Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 1958, **7**, 561-573.)

Cochran (W.D.), Cornfield (M.) et Friedberg (D.). — Congenital rubella and thrombocytopenia : report of two cases with initial and follow-up viral cultures. (*Pediatrics*, 1965, **36**, 268-270.)

Cooper (L.Z.), Green (R.H.), Krugman (S.), Giles (J.P.) et Mirick (G.S.). — Neonatal thrombocytopenic purpura and other manifestations of rubella contracted *in utero*. (*Amer. J. Dis. Child.*, 1965, **110**, 416-427.)

Cooper (L.Z.). — German measles. (*Scient. Amer.*, 1966, **215**, 30-37 et 130.)

Cotlier (E.), Fox (J.), Bohigian (G.), Beaty (C.) et Du Pree (A.). — Pathogenic effects of rubella virus on embryos and newborn rats. (*Nature*, 1968, **217**, 38-40.)

Cusumano (C.L.). — Density gradient centrifugation studies of rubella virus. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1966, **122**, 461-465.)

Debré (R.), Thieffry (S.) et Alloiteau (J.J.). — Rubéole et malformations congénitales. (*Arch. Fr. Péd.*, 1946, **3**, 408.)

Dent (P.B.), Olson (G.B.), Good (R.A.), Rawls (W.E.), South (M.A.) et Melnick (J.L.). — Rubella virus. Leucocyte interactions and its role in the pathogenesis of the congenital rubella syndrome. (*Lancet*, 1968, **1**, 291-293.)

Desmyter (J.), Rawls (W.E.), Melnick (J.L.), Yow (M.D.) et Barrett (F.F.). — Interferon in congenital rubella : response to live attenuated measles vaccine. (*J. Immunol.*, 1967, **99**, 771-777.)

De Somer (P.), Billiau (A.), De Clercq (E.) et Schonne (E.). — Rubella virus interference and interferon production. (*Antonie van Leeuwenhoeck*, 1967, **33**, 237-245.)

Doedge (T.C.) et Kim (K.S.V.). — Studies of rubella and its prevention with immune globulin. (*J.A.M.A.*, 1967, **200**, 104-110.)

Dudgeon (J.A.), Butler (N.R.) et Plotkin (S.A.). — Further serological studies on the rubella syndrome. (*Brit. Med. J.*, 1964, **2**, 155-160.)

Dudgeon (J.A.). — Serological studies on the rubella syndrome. (*Arch. Ges. Virusforsch.*, 1965, **16**, 501-505.)

Estela (L.A.). — Rubella rivus : direct fluorescence. (*Amer. J. Clin. Path.*, 1967, **47**, 129-133.)

Esterly (J.R.), Slusser (R.J.) et Ruebner (B.H.). — Hepatic lesions in the congenital rubella syndrome. (*Pediatrics*, 1967, **71**, 676-685.)

Fabiyi (A.), Sever (J.L.), Ratner (N.) et Caplan (B.). — Rubella virus : growth characteristics and stability of infectious virus and complement fixing antigen. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1966, **122**, 392-396.)

Fabiyi (A.), Gitnick (G.L.) et Sever (J.L.). — Rubella virus complement fixing antigen : sedimentable and non-sedimentable antigenic components. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1967, **124**, 1137-1142.)

— Chronic rubella virus infection in the ferret. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1967, **125**, 766-771.)

Ferguson (A.W.). — Rubella as a cause of thrombocytopenic purpura. (*Pediatrics*, 1960, **25**, 400-408.)

Field (A.M.), Vandervelde (E.M.), Thompson (K.M.) et Hutchinson (D.N.). — A comparison of the haemagglutination-inhibition test and the neutralisation test for the detection of rubella antibody. (*Lancet*, 1967, **2**, 182-184.)

Frankel (J.W.). — Neutralizing antibody responses of guinea-pigs to inactivated rubella virus vaccine. (*Nature*, 1964, **204**, 655-656.)

Friedmann (I.) et Wright (M.I.). — Histopathological changes in the fœtal and infantile inner ear caused by maternal rubella. (*Brit. Med. J.*, 1966, **2**, 20-23.)

Fruehan (A.E.). — Erythema multiforme exudativum and arthritis following infection with rubella. (*N.Y. State J. Med.*, 1963, **63**, 859-863.)

Furukawa (T.), Plotkin (S.), Sedwick (D.) et Profeta (M.). — Haemagglutinin of rubella virus. (*Nature*, 1967, **215**, 172-173.)

Furukawa (T.), Vaheri (A.) et Plotkin (S.A.). — Growth of rubella virus in BHK 21 cells. III. Production of complement fixing antigens. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1967, **125**, 1098-1102.)

Geiger (J.C.). — Epidemic of German measles in city adjacent to army cantonment and its probable relation thereto. (*J.A.M.A.*, 1918, **70**, 1818-1820.)

Gispen (R.) et Brand-Saathof. — Assay of rubella antibodies by immunofluorescence, complement fixation and neutralization. (*Arch. Ges. Virusforsch.*, 1967, **21**, 334-348.)

Gitnick (G.L.), Vincent (M.M.), Auletta (A.), Ley (A.), Tzan (N.) et Sever (J.L.). — Production of rubella hemagglutining antigen in suspension cultures. (*Appl. Microbiol.*, 1967, **15**, 1244-1247.)

Givan (K.F.), Rozee (K.R.) et Rhodes (A.J.). — Incidence of rubella antibodies in female subjects. (*Canad. Med. Ass. J.*, 1965, **92**, 126-128.)

Goffe (A.). — A diploid human cell strain with chronic inapparent rubella infection. (*Arch. Ges. Virusforsch.*, 1965, **16**, 469.)

Grayston (J.T.) et Watten (R.A.). — Epidemic rubella in Taiwan 1957-1958. III. Gamma-globulin in the prevention of rubella. (*New Engl. J. Med.*, 1959, **261**, 1145-1150.)

Grayston (J.T.), Jui-Yun Peng et Lee (G.C.Y.). — Congenital abnormalities following gestational rubella in Chinese. (*J.A.M.A.*, 1967, **202**, 1-6.)

Green (R.H.), Balsamo (M.R.), Giles (J.P.), Krugman (S.) et Mirick (G.S.). — Studies on the experimental transmission clinical course, epidemiology and prevention of rubella. (*Trans. Ass. Amer. Phys.*, 1964, **77**, 118-125.)

— Studies of the natural history and prevention of rubella. (*Amer. J. Dis. Child.*, 1965, **110**, 348-365.)

Gregg (N.M.). — Congenital cataract following German measles in the mother. (*Trans. Ophtal. Soc. Austr.* (B.M.A.), 1941, **3**, 35-46.)

— Further observations on congenital defects in infants following maternal rubella. (*Trans. Ophtal. Soc. Austr.*, 1946, **4**, 119-131.)

Guerry du Pont (D.). — Congenital glaucoma following maternal rubella ; report of two cases. (*Amer. J. Ophtal.*, 1946, **29**, 190-193.)

Gunalp (A.). — Growth and cytopathic effect of rubella virus in a line of green monkey kidney cells. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1965, **118**, 85-90.)

Habel (K.). — Transmission of rubella to *Macacus mulatta* monkeys. (*Public Health Rep.*, 1942, **57**, 1126-1139.)

Halonen (P.E.), Casey (H.L.), Stewart (J.A.) et Hall (A.D.). — Rubella complement fixing antigen prepared by alkaline extraction of virus grown in suspension culture of BHK-21 cells. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1967, **125**, 167-172.)

Hambidge (K.M.), Shaffer (D.), Marshall (W.C.) et Hayes (K.). — Congenital rubella : report of two cases with generalized infection. (*Brit. Med. J.*, 1966, **1**, 650-652.)

Hammond (K.). — Skin dimples and rubella. (*Pediatrics*, 1967, **39**, 291-292.)

Hardy (J.B.), Monif (G.R.G.) et Sever (J.L.). — Studies in congenital rubella, Baltimore, 1964-1965. II Clinical and virologic. (*Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1966, **118**, 97-108.)

Hassan (S.A.) et Cochran (K.W.). — Immunohemagglutination test for rapid detection and assay of rubella antibodies. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1967, **125**, 430-435.)

Hayflick (L.) et Moorhead (P.S.). — The serial cultivation of human diploid cell strains. (*Exp. Cell. Res.*, 1961, **25**, 585-621.)

Heggie (A.D.) et Robbins (F.C.). — Experimental rubella in *rhesus* monkeys. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1963, **114**, 750-754.)

— Rubella in naval recruits. A virologic study. (*New Engl. J. Med.*, 1964, **271**, 231-234.)

Heggie (A.D.) et Weir (W.). — Isolation of rubella virus from a mother and fetus. (*Pediatrics*, 1964, **34**, 278-280.)

Heggie (A.D.). — Rubella : current concepts in epidemiology and teratology. (*Ped. Clin. North Amer.*, 1966, **13**, 251-266.)

Henry (M.) et Sohier (R.). — Enquête immunologique sur la rubéole (recherche des anticorps neutralisants sur 201 sérums de sujets de sexe féminin). (*Rev. Hyg. Méd. Soc.*, 1967, **15**, 255-266.)

Hildebrandt (H.M.) et Maassab (H.F.). — Rubella synovitis in a one-year-old patient. (*New Engl. J. Med.*, 1966, **274**, 1428-1430.)

Hillenbrand (F.K.M.). — The blood picture in rubella. Its place in diagnosis. (*Lancet*, 1956, **271**, 66-68.)

Hiro (Y.) et Tasaka (S.). — Die Röteln sind eine Virus-Krankheit. (*Mschr. Kinderh.*, 1938, **76**, 328-332.)

Holmes (I.H.) et Warburton (M.F.). — Is rubella an arbovirus ? (*Lancet*, 1967, **2**, 1233-1236.)

Hope-Simpson (A.E.). — Rubella and polyarthritis. (*Brit. Med. J.*, 1940, **1**, 924-926.)

Hopps (H.E.), Bernheim (B.C.), Nisalak (A.), Tijo (J.H.) et Smadel (J.E.). — Biologic characteristics of a continuous kidney cell line derived from the African green monkey. (*J. Immunol.*, 1963, **91**, 416-424.)

Horstmann (D.M.), Banatvala (J.E.), Riordan (J.T.), Payne (M.C.), Whittemore (R.), Opton (E.M.) et Florey (C.). — Maternal rubella and the rubella syndrome in infants. (*Amer. J. Dis. Child.*, 1965, **110**, 408-415.)

Horstmann (D.M.), Riordan (J.T.), Ohtwara (M.) et Niederman (J.C.). — A natural epidemic of rubella in a closed population ; virological and epidemiological observations. (*Arch. Ges. Virusforsch.*, 1965, **16**, 482-487.)

Horstmann (D.M.). — Rubella and the rubella syndrome : problems and progress. (*Med. Clin. North Amer.*, 1967, **51**, 587-598.)

Hull (R.H.), Cherry (W.R.) et Tritch (O.J.). — Growth characteristics of monkey kidney cell strains LLC-MK_1, LLC-MK_2 and LLC-MK_2 (NCTC-3196) and their utility in virus research. (*J. Exp. Med.*, 1962, **115**, 903-918.)

Hull (R.H.) et Butorac (G.). — The utility of rabbit kidney cell strain, LLC-RK1 to rubella virus studies. (*Amer. J. Epidemiol.*, 1966, **83**, 509-517.)

Hutchinson (D.N.) et Thompson (K.M.). — Continuous rabbit kidney cell cultures in the diagnosis of rubella infections. (*Mth. Bull. Minist. Hlth. Lab. Serv.*, 1965, **24**, 385.)

Ingalls (T.H.). — Preventive medicine and epidemiology rubella. I. The epidemiology of rubella. (*Amer. J. Med. Sci.*, 1967, **253**, 125-132.)

Johnson (R.E.) et Hall (A.P.). — Rubella arthritis, report of cases studied by latex tests. (*New Engl. J. Med.*, 1958, **258**, 743-745.)

Kenny (F.M.), Michaels (R.H.) et Davis (K.S.). — Rubella encephalopathy. (*Amer. J. Dis. Child.*, 1965, **110**, 374-380.)

Kissel (P.) et Arnould (G.). — Les maladies à virus lymphotrope. Leurs manifestations nerveuses. (1 vol., Paris, G. Doin édit., 1952.)

Korns (R.F.). — Prophylaxis of German measles with immune serum-globulin. (*J. Infect. Dis.*, 1952, **90**, 183-189.)

Korones (S.B.), Ainger (L.E.), Monif (G.R.G.), Roane (J.), Sever (J.L.) et Fuste (F.). — Congenital rubella syndrome : new clinical aspects with recovery of virus from affected infants. (*J. Pediatrie*, 1965, **67**, 166-181.)

— Congenital rubella syndrome : study of 22 infants. Myocardial damage and other new clinical aspects. (*Amer. J. Dis. Child.*, 1965, **110**, 434-440.)

Kresky (B.). — Rubella retinitis. (*Amer. J. Dis. Child.*, 1967, **113**, 305-310.)

Krugmann (S.), Ward (R.), Jacobs (K.G.) et Lazar (M.). — Studies on rubella immunization. I. Demonstration of rubella without rash. (*J.A.M.A.*, 1953, **151**, 285-288.)

Krugmann (S.). — Rubella : clinical and epidemiological aspects. (*Arch. Ges. Virusforsch.*, 1965, **16**, 477-482.)

Lafer (C.Z.) et Morrisson (A.N.). — Purpura and anemia in rubella syndrome. (*Pediatrics*, 1966, **38**, 499-502.)

Lamy (M.) et Séror (M.E.). — La rubéole de la femme enceinte. (*Arch. Ges. Virusforsch.*, 1965, **16**, 377-390.)

Leerhoy (J.). — Growth of rubella virus in a rabbit kidney cell line RK 13. (*Act. Path. Microb. Scand.*, 1965, **65**, 597-599.)

— Cytopathic effect of rubella in a rabbit-cornea cell line. (*Science*, 1965, **149**, 633-634.)

— Neutralization of rubella virus in a rabbit cornea cell line (SIRC). (*Act. Path. Microb. Scand.*, 1966, **67**, 158-159.)

— The influence of different media on cell morphology and rubella virus titer in a rabbit cornea cell line (SIRC). (*Arch. Ges. Virusforsch.*, 1966, **19**, 210-220.)

Lehmann (N.I.) et Ferris (A.A.). — Rubella. I. Isolation of rubella virus ; laboratory aspects. (*Med. J. Aust.*, 1963. **2**, 1015-1016.)

Lennette (E.H.), Schmidt (N.J.) et Magoffin (R.L.). — Serology of rubella ; comparison of fluorescent antibody, complement fixation and neutralization tests for diagnosis of current infections and determination of sero-immunity. (*Calif. Med.*, 1967, **107**, 223-231.)

— The haemagglutination-inhibition test for rubella. (*J. Immunol.*, 1967, **99**, 785-794.)

Lennette (E.H.), Woodie (J.D.) et Schmidt (N.J.). — A modified indirect immunofluorescent staining technique for demonstration of rubella antibodies in human sera. (*J. Lab. Clin. Med.*, 1967, **69**, 689-695.)

Liebhaber (H.), Riordan (J.T.) et Horstmann (D.M.) — Replication of rubella virus in a continuous line of African green monkey kidney cells (Vero). (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1967, **125**, 636-643.)

Lindquist (J.M.), Plotkin (S.A.), Gilden (R.V.) et Williams (M.L.). — Congenital rubella syndrome as a systemic infection. Studies of affected infants born in Philadelphia, U.S.A. (*Brit. Med. J.*, 1965, **2**, 1401-1406.)

Lock (F.R.), Gatling (H.B.) et Wells (H.B.). — Difficulties in the diagnostic of congenital abnormalities. Experience of the effect of rubella on pregnancy. (*J.A.M.A.*, 1961, **178**, 711-714.)

Lokietz (H.) et Reynolds (F.A.). — Postrubella thrombocytopenic purpura. (*Lancet*, 1965, **88**, 226-230.)

Loudon (I.S.L.). — Polyarthritis in rubella. (*Brit. Med. J.*, 1953, **1**, 1388.)

Lundström (R.). — Passive immunization against rubella. (*Arch. Ges. Virusforsch.*, 1965, **16**, 506-508.)

Maassab (H.F.) et Cochran (K.W.). — Influence of 5-fluorodeoxyuridine on growth characteristics of rubella virus. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1964, **117**, 410-413.)

— Rubella virus : inhibition *in vitro* by amantadine hydrochloride. (*Science*, 1964, **145**, 1443-1444.)

Maassab (H.F.) et Veronelli. — Characteristics of serially propagated monkey kidney cell cultures with persistent rubella infection. (*J. Bacteriol.*, 1966, **91**, 436-441.)

Maes (R.), Vaheri (A.), Sedwick (D.) et Plotkin (S.). — Synthesis of virus and macromolecules by rubella-infected cells. (*Nature*, 1966, **210**, 384-385.)

Magnusson (J.H.). — Acute thrombocytopenic purpura following rubella. (*Act. Med. Scand.*, 1946, **126**, 40-48.)

Magnusson (P.) et Norry (E.C.J.). — On the morphology of rubella virus. (*Arch. Ges. Virusforsch.*, 1965, **16**, 412-414.)

Magnusson (P.) et Skaaret (P.). — Purification studies of rubella virus. (*Arch. Ges. Virusforsch.*, 1967, **20**, 374-382.)

Manson (M.M.), Logan (W.P.D.) et Loy (R.M.). — Report on public health and medical subjects : n° 1001, Ministry of Health. (*H.M.S.O.*, 1960.)

Marcus (P.I.) et Carver (D.H.) — Hemabsorption-negative plaque test : new assay for rubella virus revealing a unique interference. (*Science*, 1965, **149**, 983-986.)

Martin du Pan (R.), Huygelen (C.), Peetermans (J.) et Prinzie (A.). — Attenuation of rubella virus by serial passage in primary rabbit kidney cells. III. Clinical trials in infants. (*Pediat. Res.*, 1968, **2**, 38-42.)

Mc Carthy (K.), Taylor-Robinson (C.H.) et Pillinger (S.E.). — Isolation of rubella virus from cases in Britain. (*Lancet*, 1963, **2**, 593-598.)

Mc Carthy (K.) et Taylor-Robinson (C.H.). — Growth and cytopathic effects of rubella virus in primary rabbit tissue culture. (*Arch. Ges. Virusforsch.*, 1965, **16**, 415-418.)

— Rubella. (*Brit. Med. Bull.*, 1967, **13**, 183-191.)

Mc Donald (J.C.). — Gamma-globulines for prevention of rubella in pregnancy. (*Brit. Med. J.*, 1963, **2**, 416-418.)

Mc Donald (J.C.) et Peckham (C.S.). — Gamma-globulin in prevention of rubella and congenital defect : a study of 30.000 pregnancies. (*Brit. Med. J.*, 1967, **3**, 633-637.)

Mc Kay (D.G.) et Margaretten (W.). — Disseminated intravascular coagulation in virus diseases. (*Arch. Intern. Med.*, 1967, **120**, 139-142.)

Mc Lean (D.M.), Mc Naughton (G.A.), Givan (K.F.), Best (J.M.), Smith (P.A.) et Coleman (M.A.). — Rubella virus infections during pregnancy, Toronto, 1963-1966. (*Canad. Med. Ass. J.*, 1966, **95**, 1174-1178.)

Mc Pherson (I.) et Montagnier (L.). — Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virus. (*Virology*, 1964, **23**, 291-294.)

Mellman (W.J.), Plotkin (S.A.), Moorhead (P.S.) et Hartnett (E.M.). — Rubella infection of human leukocytes. (*Amer. J. Dis. Child.*, 1965, **110**, 473-476.)

Menser (M.A.), Harley (J.D.), Hertzberg (R.), Dorman (D.C.) et Murphy (A.M.). — Persistence of virus in lens for three years after prenatal rubella. (*Lancet*, 1967, **2**, 387-388.)

Meyer (H.M.), Parkman (P.D.) et Panos (T.C.). — Attenuated rubella virus. II. Production of an experimental live-virus vaccin and clinical trial. (*New Engl. J. Med.*, 1966, **275**, 575-580.)

Meyer (H.M.) et Parkman (P.D.). — Preventive medicine and epidemiology. III. The immunology of rubella. (*Amer. J. Med. Sci.*, 1967, **253**, 140-147.)

Monif (G.R.G.), Sever (J.L.), Schiff (G.M.) et Traub (R.G.). — Isolation of rubella virus from products of conception. (*Amer. J. Obst. Gyn.*, 1965, **91**, 1143-1146.)

Monif (G.R.G.), Asofsky (R.) et Sever (J.L.). — Hepatic dysfunction in the congenital rubella syndrome. (*Brit. Med. J.*, 1966, **1**, 1086-1088.)

Monif (G.R.G.), Hardy (J.B.) et Sever (J.L.). — Studies in congenital rubella, Baltimore, 1964-1965. I. Epidemiologic and virologic. (*Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1966, **118**, 85-96.)

Morse (E.), Zinkham (W.H.) et Jackson (D.P.). — Thrombocytopenic purpura following rubella infection in children and adults. (*Arch. Intern. Med.*, 1966, **117**, 573-579.)

Murphy (A.M.) et Reid (R.R.). — A comparison of neuralizing antibiodies to rubella virus in gamma-globulin and « convalescent » sera. (*Med. J. Austr.*, 1967, **1**, 369-371.)

Naeye (R.L.) et Blanc (W.). — Pathogenesis of congenital rubella. (*J.A.M.A.*, 1965, **194**, 1277-1283.)

Neva (F.A.) et Weller (T.H.). — Advances in our knowledge of rubella. (*Indust. Tropic. Health*, 1964, 90-95.)

Neva (F.A.), Alford (C.A. Jr) et Weller (T.H.). — Emerging perspective of rubella. (*Bacteriol. Rev.*, 1964, **28**, 444-451.)

Neva (F.A.) et Weller (T.H.). — Rubella interferon and factors influencing the indirect neutralization test for rubella antibody. (*J. Immunol.*, 1964, **93**, 466-473.)

Nicolas (A.). — Méthodes de laboratoire appliquées au diagnostic de la rubéole. La technique d'inhibition de l'hémagglutination. (*Lyon Méd.*, 1967, **27**, 17-52.)

Norrby (E.). — Hemagglutination by measles virus. 4. A simple procedure for production of high potency antigen for hemagglutination-inhibition (H.I.) tests. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1962, **111**, 814-818.)

Nusbacher (J.), Hirschhorn (K.) et Cooper (L.Z.). — Chromosomal abnormalities in congenital rubella. (*New Engl. J. Med.*, 1967, **276**, 1409-1413.)

O'Day (K.). — A case of infantile glaucoma associated with maternal rubella. (*Med. J. Aust.*, 1957, **44**, 861-862.)

Oxford (J.S.), Potter (C.W.) et Sutton (R.N.P.). — Determination of the type of nucleic acid in rubella virus using 5-bromo-2'-deoxyuridine. (*Nature*, 1965, **207**, 324-326.)

Oxford (J.S.) et Schild (G.C.). — Growth of rubella virus in the hamster. (*Virology*, 1966, **28**, 780-782.)

Oxford (J.S.). — The growth of rubella virus in small laboratory animals. (*J. Immunol.*, 1967, **98**, 697-701.)

Oxford (J.S.) et Schild (G.C.). — The evaluation of antiviral compounds for rubella virus using organ cultures. (*Arch. Ges. Virusforsch.*, 1967, **22**, 349-356.)

Pan American Health Organisation. — Summaries : International Conference on Vaccines against Viral and Rickettsial Diseases of Man, octobre 1966.

Parkman (P.D.), Buescher (E.L.) et Artenstein (M.S.). — Recovery or rubella virus from army recruits. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1962, **111**, 225-230.)

Parkman (P.D.), Buescher (E.L.), Artenstein (M.S.), Mc Cown (J.M.), Mundon (F.K.) et Druzd (A.D.). — Studies of rubella. I. Properties of the virus. (*J. Immunol.*, 1964, **93**, 595-607.)

Parkman (P.D.), Mundon (F.K.), Mc Cown (J.M.) et Buescher (E.L.). — Studies of rubella. II. Netralization of the virus. (*J. Immunol.*, 1964, **93**, 608-617.)

Parkman (P.D.). — Biological characteristics of rubella virus. (*Arch. Ges. Virusforsch.*, 1965, **16**, 401-411.)

Parkman (P.D.), Phillips (P.E.), Kirschstein (R.L.) et Meyer (H.M. Jr). — Experimental rubella virus infection in the rhesus monkey. (*J. Immunol.*, 1965, **95**, 743-752.)

Parkman (P.D.), Phillips (P.E.) et Meyer (H.M. Jr). — Experimental rubella virus infection in pregnant monkeys. (*Amer. J. Dis. Child*, 1965, **110**, 390-394.)

Parkman (P.D.), Meyer (H.M.), Kirschstein (R.L.), Hopps (H.E.) et Panos (Th.C.). — Attenuated rubella virus. (*New Engl. J. Med.*, 1966, **275**, 569-580.)

Peetermans (J.) et Huygelen (C.). — L'emploi d'hématies de pigeons dans le test d'inhibition de l'hémagglutination de la rubéole. (*Presse Médic.*, 1967, **75**, 2177-2178.)

— Attenuation of rubella virus by serial passage in primary rabbit kidney cell cultures. I. Growth characteristics *in vitro* and production of experimental vaccines at different passage levels. (*Arch. Ges. Virusforsch.*, 1967, **21**, 133-143.)

— Propagation of rubella virus in primary swine kidney tissue cultures. (*Zent. Bakt. Paras. Infekt. Hyg.*, 1967, **204**, 440-441.)

Peetermans (J.), Huygelen (C.) et Bouillet (A.). — Freeze-dried rubella virus hemagglutinating antigen. (*Appl. Microbiol.*, 1968, **16**, 154.)

Péries (J.R.) et Chany (C.). — Activité hémagglutinante et hémolytique du virus morbilleux. (*C.R. Acad. Méd. Paris*, 1960, **251**, 820.)

Phillips (C.A.), Behbehari (A.M.), Johnson (L.W.) ei Melnick (J.L.). — Isolation of rubella virus an epidemic characterized by rash and arthritis. (*J.A.M.A.*, 1965, **191**, 615-618.)

Phillips (C.A.), Melnick (J.L.), Yow (M.), Bayatpour (M.) et Burkhardt (M.). — Persistence of virus in infants with congenital rubella and in normal infants with a history of maternal rubella. (*J.A.M.A.*, 1965, **193**, 1027-1029.)

Phillips (C.A.), Melnick (J.L.) et Burkhardt (M.). — Isolation, propagation and neutralization of rubella virus in cultures of rabbit cornea (S.I.R.C.) cells. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1966, **122**, 783-786.)

Pitt (D.) et Keir (E.H.). — Results of rubella in pregnancy. (*Med. J. Austr.*, 1965, **2**, 647-651.)

PLOTKIN (S.A.), DUDGEON (J.A.) et RAMSAY (A.M.). — Laboratory studies on rubella and the rubella syndrome. (*Brit. Med. J.*, 1965, **11**, 1296-1299.)

PLOTKIN (S.A.). — Virologic assistance in the management of german measles in pregnancy. (*J.A.M.A.*, 1964, **190**, 765-768.)

PLOTKIN (S.A.), BOUÉ (A.) et BOUÉ (J.G.). — The *in vitro* growth of rubella virus in human embryo cells. (*Amer. J. Epidemiol.*, 1965, **81**, 71-85.)

PLOTKIN (S.A.), CORNFELD (D.) et INGALLS (T.H.). — Studies of immunization with living rubella virus. Trials in children with a strain cultured from an aborted fetus. (*Amer. J. Dis. Child.*, 1965, **110**, 381-389.)

PLOTKIN (S.A.), OSKI (F.A.), HARTNETT (E.M.), HERVADA (A.R.), FRIEDMAN (S.) et GOWING (J.). — Some recently recognized manifestations of the rubella syndrome. (*J. Pediat.*, 1965, **67**, 182-191.)

PLOTKIN (S.A.). — Plaquing of rubella virus in RK 13 cells. (*Arch. Ges. Virusforsch.*, 1965, **16**, 423-425.)

— Preventive medicine and epidemiology. II. The virology of rubella. (*Amer. J. Med. Sci.*, 1967, **253**, 132-140.)

PLOTKIN (S.A.), COCHRAN (W.), LINDQUIST (J.), COCHRAN (G.C.), SCHAFFER (D.B.), SCHEIE (H.G.) et FURUKAWA (T.). — Congenital rubella syndrome in late infancy. (*J.A.M.A.*, 1967, **200**, 435-441.)

PLOTKIN (S.A.), FARQUHAR (J.), KATZ (M.) et INGALLS (T.H.). — A new attenuated rubella virus grown in human fibroblasts : evidence for reduced nasopharyngeal excretion. (*Amer. J. Epidemic.*, 1967, **80**, 468-477.)

PLOTKIN (S.A.) et VAHERI (A.). — Human fibroblasts infected with rubella virus produce a growth inhibitor. (*Science*, 1967, **156**, 659-661.)

PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE. — Incidence of rubella antibodies among pregnant women in six areas : prophylactic effect of two doses of gamma-globulin. (*Brit. Med. J.*, 1967, **3**, 638-640.)

RABINOWITZ (J.G.), WOLF (B.S.), GREENBERG (E.I.) et RAUSEN (A.R.). — Osseous changes in rubella embryopathy. (*Radiology*, 1965, **85**, 494-500.)

RAUSEN (A.R.), LONDON (R.D.), MIZRAHI (A.) et COOPER (L.Z.). — Generalized bone changes and thrombocytopenic purpura in association with intra-uterine rubella. (*Pediatrics*, 1965, **36**, 264-268.)

RAWLS (W.E.), MELNICK (J.L.), ROSENBERG (H.S.) et BAYATPOUR (M.). — Spontaneous virus carrier cultures and post-mortem isolation of virus from infants with congenital rubella. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1965. **120**. 623-626.)

RAWLS (W.E.) et MELNICK (J.L.). — Rubella virus carrier cultures derived from congenitally infected infants. (*J. Exper. Med.*, 1966, **123**, 795-816.)

RAWLS (W.E.), DESMYTER (J.) et MELNICK (J.L.). — Rubella virus neutralization by plaque reduction. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1967, **124**. 167-172.)

RAYBAUD (A.). — Hématologie leucocytaire dans la rubéole. Etude statistique. (*Marseille Méd.*, 1966. **3**, 224-226.)

REDDICK (A.) et ROESEL (C.E.). — Rubella virus : growth and cytopathic effect in primary cultures of cells of rabbit embryos. (*Science*, 1966. **151**. 1405-1406.)

REISS (J.S.) et PRYLES (C.V.). — Thrombocytopenia in congenital rubella. (*New Engl. J. Med.*, 1966. **275**. 264-265.)

RHIM (J.S.) et SCHELL (K.). — Cytopathic and plaque assay of rubella virus in a line of African green monkey kidney cells (Vero). (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1967, **125**, 602-606.)

RHODES (A.J.), ROZEE (K.R.), DOANE (F.W.) et GIVAN (K.F.). — The elusive aetiological agent of rubella. (*Trans. Roy. Soc. Canada*, 1963. **1**. 367-376.)

RORKE (L.B.) et SPIRO (A.J.). — Cerebral lesions in congenital rubella syndrome. (*Pediatrics*, 1967. **70**. 243-255.)

ROSEN (L.). — Hemagglutination and hemagglutination-inhibition with measles virus. (*Virology*, 1961. **13**, 139-141.)

ROZEE (K.R.), GIVAN (K.F.), DOANE (F.W.) et RHODES (A.J.). — A plaque method for rubella virus assay. (*Canada Med. Ass. J.*, 1963, **89**. 314-315.)

RUDOLPH (A.J.), SINGLETON (E.B.), ROSENBERG (H.S.), SINGER (D.B.) et PHILLIPS (C.A.). — Osseous manifestations of the congenital rubella syndrome. (*Amer. J. Dis. Child.*, 1965. **110**, 428-433.)

RUDOLPH (A.J.), YOW (M.D.), PHILIPPS (C.A.), DESMOND (M.M.), BLATTNER (R.J.) et MELNICK (J.L.). — Transplacental rubella infection in newly born infants. (*J.A.M.A.*, 1965. **191**. 843-845.)

Schaeffer (M.), Orsi (E.V.) et Widelock (D.). — Applications of immunofluorescence in public health virology. (*Bact. Rev.*, 1964, **28**, 402-408.)

Schell (K.) et Wong (K.T.). — Stability and storage of rubella complement fixing antigen. (*Nature*, 1966, **212**, 621-625.)

Schell (K.), Wong (K.T.), Turner (H.C.) et Huebner (R.J.). — Production of rubella complement fixing antigen in BHK-21 cells. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1966, **122**, 832-836.)

Schiff (G.M.), Sever (J.L.) et Huebner (R.J.). — Rubella virus : neutralizing antibody in commercial gammaglobulin. (*Science*, 1963, **142**, 58-60.)

Schiff (G.M.) et Dine (M.S.). — Transmission of rubella from newborns. A controlled study among young adult women and report of an unusual case. (*Amer. J. Dis. Child.*, 1965, **110**, 447-451.)

Schiff (G.M.), Sever (J.L.) et Huebner (R.J.). — Experimental rubella. Clinical and laboratory findings. (*Arch. Intern. Med.*, 1965, **116**, 537-543.)

Schiff (G.M.), Smith (H.D.), Dignan (P.St.J.) et Sever (J.L.). — Rubella : studies on the natural disease. The significance of antibody status and communicability among young women. (*Amer. J. Dis. Child.*, 1965, **110**, 366-369.)

Schiff (G.M.), Sutherland (J.M.), Light (L.J.) et Bloom (J.L.). — Studies on congenital rubella : preliminary results on the frequency and significance of presence of rubella virus in the newborn. (*Amer. J. Dis. Child.*, 1965, **110**, 441-443.)

Schiff (G.M.) et Sever (J.L.). — Rubella : recent laboratory and clinical advances. (*Progr. Med. Virol.*, 1966, **8**, 30-61.)

Schmidt (N.J.) et Lennette (E.H.). — The complement fixing antigen of rubella virus. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1966, **121**, 243-250.)

— Rubella complement-fixing antigens derived from the fluid and cellular phases of infected BHK-21 cells : extraction of cell-associated antigen with alkaline buffers. (*J. Immunol.*, 1966, **97**, 815-821.)

— Stability of rubella complement-fixing antigens. (*Appl. Microbiol.*, 1967, **15**, 916-920.)

Schmidt (N.J.), Lennette (E.M.) et Dennis (J.). — Density gradient centrifugation studies on rubella complement-fixing antigens. (*J. Immun.*, 1967, **99**, 399-405.)

Schmidt (N.J.), Lennette (E.H.) et Gee (P.S.). — Demonstration of rubella complement-fixing antigens of two distinct particle sizes by gel filtration on Sephadex G-200. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1966, **123**, 758-762.)

Schmidt (N.J.), Lennette (E.H.), Woodie (J.D.) et Ho (H.H.). — Identification of rubella virus isolates by immunofluorescent staining, and a comparison of the sensitivity of three cell culture systems for recovery of virus. (*J. Lab. Clin. Med.*, 1966, **68**, 502-509.)

Selzer (G.). — Virus isolation, inclusion-bodies and chromosomes in a rubella infected human embryo. (*Lancet*, 1963, **2**, 336-337.)

Sever (J.L.), Schiff (G.M.) et Traub (R.G.). — Rubella virus. (*J.A.M.A.*, 1962, **182**, 663-670.)

Sever (J.L.) et Schiff (G.M.). — Comparison of indirect and direct methods for detection of rubella virus and antibody. (*Symposium International sur la Standardisation des Vaccins contre la Rougeole et la Sérologie de la Rubéole*, Lyon, 18-19-20 juin 1964. 1 vol., Lyon, Institut Mérieux éd., 1964, pp. 126-129.)

Sever (J.L.), Schiff (G.M.) et Huebner (R.J.). — Frequency of rubella antibody among pregnant women and other human and animal populations. (*Obst. Gyn.*, 1964, **3**, 153-159.)

Sever (J.L.), Brody (J.A.), Schiff (G.M.), Mc Alister (R.) et Cutting (R.). — Rubella epidemic on St Paul Island in the Pribilofs, 1963, I. Clinical and laboratory findings for the intensive study population. (*J.A.M.A.*, 1965, **191**, 624-626.)

Sever (J.L.), Fabiyi (A.), Mc Callin (P.F.), Chu (P.T.), Weiss (W.) et Gilkeson (M.R.). — Rubella antibody among pregnant women in Hawaï. (*Amer. J. Obst. Gyn.*, 1965, **92**, 1006-1008.)

Sever (J.L.), Huebner (R.J.), Castellano (G.A.), Sarma (P.S.), Fabiyi (A.), Schiff (G.M.) et Cusumano (C.L.). — Rubella complement fixation test. (*Science*, 1965, **148**, 385-387.)

Sever (J.L.), Nelson (K.B.) et Gilkeson (M.R.). — Rubella epidemic 1964. Effect on 6.000 pregnancies. (*Amer. J. Dis. Child.*, 1965, **110**, 395-407.)

Sever (J.L.), Schiff (G.M.), Bell (J.A.), Zapikian (A.Z.), Huebner (R.J.) et Traub (R.G.). — Rubella : frequency of antibody among children and adults. (*Pediatrics*, 1965, **35**, 996-998.)

Sever (J.L.). — Epidemiology of rubella. (*First Int. Conf. Vaccines*, P.A.H.O., Washington, 1966, p. 366.)

Sever (J.L.), Huebner (R.J.), Fabiyi (A.), Monif (G.R.), Castellano (G.), Cusumano (C.L.), Traub (R.G.), Ley (A.C.), Gilkeson (M.R.) et Roberts (J.M.). — Antibody responses in acute and chronic rubella. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1966, **122**, 513-516.)

Sever (J.L.), Meier (G.W.), Widle (W.F.), Schiff (G.M.), Monif (G.R.) et Fabiyi (A.). — Experimental rubella in pregnant *rhesus* monkeys. (*J. Inf. Dis.*, 1966, **116**, 21-26.)

Sever (J.L.), Monif (G.R.G.), Cusumano (C.L.), Schiff (G.M.) et Huebner (R.J.). — Clinical and subclinical rubella following intradermal inoculation of rubella virus into human volunteers. (*Amer. J. Epidem.*, 1966, **84**, 163-166.)

Sever (J.L.), Fuccillo (D.A.), Gitnick (G.L.), Huebner (R.J.), Gilkeson (M.R.), Ley (A.C.), Tzan (N.) et Traub (R.G.). — Rubella antibody determinations. (*Pediatrics*, 1967, **40**, 789-797.)

Sheridan (M.D.). — Final report of prospective study of children whose mothers had rubella in early pregnancy. (*Brit. Med. J.*, 1964, **2**, 536-539.)

Sherman (F.E.), Michaels (R.H.) et Kenny (F.M.). — Acute encephalopathy (encephalitis) complicating rubella. (*J.A.M.A.*, 1965, **192**, 675-681.)

Sigurdardottir (B.), Givan (K.F.), Rozee (K.R.) et Rhodes (A.J.). — Association of virus with cases of rubella studied in Toronto : propagation of the agent and transmission to monkeys. (*Canada Med. Ass. J.*, 1963, **88**, 128-132.)

Singer (D.B.), Rudolph (A.J.), Rosenberg (H.S.), Rawls (W.E.) et Boniuk (M.). — Pathology of the congenital rubella syndrome. (*Pediatrics*, 1967, **71**, 665-675.)

Singleton (E.B.), Rudolph (A.J.), Rosenberg (H.S.) et Singer (D.B.). — The roentgenographic manifestations of the rubella syndrome in newborn infants. (*Amer. J. Roentg.*, 1966, **97**, 82-99.)

Sohier (R.). — Diagnostic des maladies à virus. (1 vol., Flammarion édit., mise à jour 1966, pp. 691-703 *b*.)

Soothill (J.F.), Hayes (K.) et Dudgeon (J.A.). — The immuno-globulins in congenital rubella. (*Lancet*, 1966, **1**, 1385-1388.)

Steen (E.) et Torp (K.H.). - Encephalitis and thrombocytopenic purpura after rubella. (*Arch. Dis. Child.*, 1956, **31**, 470-473.)

Stern (H.). — Rubella virus complement fixation test. (*Nature*, 1965, **208**, 200-201.)

Stern (H.) et Williams (B.M.). — Isolation of rubella virus in a case of neonatal giant-cell hepatitis. (*Lancet*, 1966, **1**, 293-295.)

Stewart (G.L.), Parkman (P.D.), Hopps (H.E.), Douglas (R.D.), Hamilton (J.P.) et Meyer (H.M.). — Rubella virus hemagglutination-inhibition test. (*New Engl. J. Med.*, 1967, **276**, 554-557.)

Stoker (M.) et Mc Pherson. — I. Syrian hamster fibroblast cell line BHK-21 and its derivatives. (*Nature*, 1964, **203**, 1355-1357.)

Stokes (J. Jr), Weibel (R.E.), Buynak (E.B.) et Hilleman (M.R.). — Clinical and laboratory tests of Merck strain live attenuated rubella virus vaccine. (*First Int. Conf. Vaccines Ag. Viral and Rickett-Infections.* Scient. Public 147, P.A.H.O., 1967.)

Svedmyr (A.) et Thoren (C.). — Rubella immunity of pregnant women in Stockholm. (*Act. Paediat. Scand.*, 1967, **56**, 405-407.)

Svenningsen (N.W.). — Thrombocytopenia after rubella. (*Act. Paediat. Scand.*, 1965, **54**, 97-100.)

Swan (C.), Tostevin (A.), Moore (B.), Mayo (H.) et Black (G.H.B.). — Congenital defects in infants following infectious diseases during pregnancy. (*Med. J. Aust.*, 1942, **2**, 201-210.)

Taylor-Robinson (C.H.), Mc Carthy (K.), Grylls (S.G.) et O'Ryan (E.M.). — Plaque-formation by rubella virus. (*Lancet*, 1964, **1**, 1364-1365.)

Tondury (G.). — Facteurs étiologiques des malformations humaines. (*Triangle*, 1965, **7**, 90-100.)

Töndury (G.) et Smith (D.W.). — Fetal rubella pathology. (*J. Pediat.*, 1966, **68**, 867-879.)

Tron (Ph.). — La rubéole congénitale. II. Etude clinique. (*Arch. Fr. Péd.*, 1967, **24**, 351-362.)

Vaheri (A.), Sedwick (W.D.), Plotkin (S.A.) et Maes (R.). — Cytopathic effect of rubella virus in BHK-21 cells and growth to high titers in suspension culture. (*Virology*, 1965, **27**, 239-241.)

Vaheri (A.), Maes (R.), Sedwick (W.D.) et Plotkin (S.A.). — Rubella virus purification and replication in BHK 21 cells. (*Fed. Proc.*, 1966, **25**, 312.)

VAHERI (A.) et CRISTOFALO (V.J.). — Metabolism of rubella virus-infected BHK-21 cells. (*Arch. Ges. Virusforsch.*, 1967, **21**, 425-436.)

VAHERI (A.), SEDWICK (W.D.) et PLOTKIN (S.A.). — Growth of rubella virus in BHK-21 cells. I. Production, assay and adaption of virus. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1967, **125**, 1086-1092.)

— Growth of rubella virus in BHK-21 cells. II. Enhanging effect of DEAE-dextran, semicarbazide and low doses of metabolic inhibitors. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1967, **125**, 1092-1098.)

VAN CREVELD (S.). — Micromélie et rubéole. (*Arch. Ges. Virusforsch.*, 1965, **16**, 392.)

VERONELLI (J.A.), MAASSAB (H.F.) et HENNESSY (A.V.). — Isolation in tissue culture at an interfering agent from patients with rubella. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1962, **111**, 472-476.)

VERONELLI (J.A.) et MAASSAB (H.F.). — Characterization of growth of rubella virus in LLC-MK2 cells. (*Arch. Ges. Virusforsch.*, 1965, **16**, 426-437.)

VERONELLI (J.A.) et ECKERT (E.A.). — A new technique for preparation of rubella complement fixing antigen. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1966, **121**, 1223-1227.)

VESIKARI (T.) et VAHERI (A.). — Rubella : a method for rapid diagnosis of a recent infection by demonstration of the IgM antibodies. (*Brit. Med. J.*, 1968, **1**, 221-223.)

VINCENT (M.M.), GITNICK (G.L.), FABIYI (A.), HENSEN (S.A.), SEVER (J.L.) et HUEBNER (R.J.). — Rubella virus : continuous and concurrent production of complement-fixing antigen and infectious virus in suspension cultures. (*Appl. Microbiol.*, 1967, **15**, 1198-1201.)

WATSON (J.R.H.). — Hepatosplenomegaly as a complication of maternal rubella : a report of two cases. (*Med. J. Austr.*, 1952, **1**, 516-517.)

WEISS (D.I.), COOPER (L.Z.) et GREEN (R.H.). — Infantile glaucoma. A manifestation of congenital rubella. (*J.A.M.A.*, 1966, **195**, 725-727.)

WELLER (T.H.) et NEVA (F.A.). — Propagation in tissue culture of cytopathic agents from patients with rubella like illness. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1962, **111**, 215-225.)

WELLER (T.H.), ALFORD (C.A. Jr) et NEVA (F.A.). — Retrospective diagnosis by serologic means of congenitally acquired rubella infections. (*New Engl. J. Med.*, 1964, **270**, 1039-1041.)

Weller (T.H.), Alford (C.A. Jr) et Neva (F.A.). — Changing epidemiologic concepts of rubella, with particular reference to unique characteristics of the congenital infection. (*Yale J. Biol. Med.*, 1965, **37**, 455-472.)

Weller (T.H.) et Neva (F.A.). — Biological characteristics of rubella virus as assayed in a human amnion culture system. (*Arch. Ges. Virusforsch.*, 1965, **16**, 393-400.)

Wesselhoeft (C.). — Rubella (german measles). (*New Engl. J. Med.*, 1947, **236**, 943-978.)

Williams (H.J.) et Carey (L.S.). — Rubella embryopathy. Roentgenologic features. (*Amer. J. Roentg.*, 1966, **97**, 92-99.)

Wong (F.C.) et Belcourt (R.J.P.). — Complement fixation test for rubella virus. (*Symposium Intern. sur la Standardisation des Vaccins contre la Rougeole et la Sérologie de la Rubéole*, Lyon, 18-19-20 juin 1964. 1 vol., Lyon, Institut Mérieux édit., 1964, pp. 136-139.)

Woods (W.A.), Johnson (R.T.), Hostetler (D.D.), Lepow (M.L.) et Robbins (F.C.). — Immunofluorescent studies on rubella-infected tissue cultures and human tissues. (*J. Immunol.*, 1966, **96**, 253-260.)

Yanez (J.E.), Thompson (G.D.), Mikkelsen (W.M.) et Bartholomev (L.E.). — Rubella arthritis. (*Ann. Int. Med.*, 1966, **64**, 773-777.)

Zinkham (W.H.) et Medearis (D.N.). — Blood and bone marrow picture in congenital rubella. (*Special Rubella Symp. Soc. Ped. Res. and Amer. Ped. Soc. Philadelphia*, May 1965.)

TABLE DES MATIÈRES

Introduction 13

Chapitre I : Historique 15

Chapitre II : Clinique 18

- Epidémiologie 18

— La rubéole acquise de l'enfant et de l'adulte 19

— La rubéole congénitale 21

Chapitre III : Le virus rubéolique 28

— Caractères physico-chimiques du virus 28

— Prélèvements pour recherche de virus 29

— Isolement et culture du virus 31

— Production de l'hémagglutinine virale 36

— Souches virales atténuées vaccinantes 39

Chapitre IV : Sérologie de la rubéole avant l'inhibition de l'hémagglutination 42

— L'immunofluorescence 42

— La neutralisation 43

— Fixation du complément 45

Chapitre V : L'inhibition de l'hémagglutination de la rubéole 47

— Principe du test d'inhibition de l'hémagglutination 47

— Techniques d'inhibition de l'hémagglutination de la rubéole déjà décrites 48

Chapitre VI : Pratique de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination en milieu hospitalier 54
— Technique de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination 54
— Autres examens virologiques pratiqués 62
— Résultats 63

Chapitre VII : Discussion 78
— Comparaison des différents tests sérologiques pour la détection des anticorps rubéoleux 78
— Intérêt de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination dans le diagnostic de la rubéole 80
— Intérêt de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination en épidémiologie 84

Conclusions 91

Bibliographie 95

IMPRIMERIE
R. FOULON & Cie
29, Rue Deparcieux, 29
PARIS — 1968